
CH
OHC
OH
OH
OHC
OH

C U P R I N S

Pag.

Pag.

INTRODUCERE

Biochimia sau chimia biologică reprezintă chimia vieţii. Din această denumire decurge că biochimia este ştiinţa care studiază structura şi transformările chimice ale substanţelor caracteristice materiei vii. Totalitatea proceselor chimice ce se desfăşoară în organismul viu, reflectînd interdependenţa lui permanentă cu mediul exterior, poartă numele de metabolismul substanţelor.

Din punct de vedere istoric, biochimia devine o ştiinţă de sine stătătoare în cea de a doua jumătate a secolului al XIX-lea, cînd ea s-a desprins din complexul ştiinţelor chimice şi biologice. Apărînd la joncţiunea unor discipline înrudite, biochimia s-a diferenţiat prin conceptele teoretice, baza metodologică şi operaţională de chimia organică şi ştiinţele chimice în general, pe de o parte şi de fiziologie, pe de alta. Deşi în primele perioade de dezvoltare a biochimiei s-au acumulat numeroase noi cunoştinţe în acest domeniu, abia decadele 4 şi 5 ale secolului al XX-lea se disting prin studiul activ şi rodnic asupra principalelor procese biochimice din organismul viu. Descifrînd bazele biochimice ale fenomenelor specifice viului, biochimia exercită o influenţă considerabilă asupra progresului tuturor ştiinţelor biologice teoretice şi aplicative. Astăzi, în mod deosebit se conturează rolul hotărîtor al biochimiei în dezvoltarea cu succes a unor ramuri „clasice" din complexul ştiinţelor biologice ca genetica, fiziologia, microbiologia, sistematica etc. Totodată biochimia a favorizat şi chiar a condiţionat naşterea unor noi direcţii de cercetare cu esenţiale implicaţii teoretice şi practice. Cercetările biochimice excepţionale din perioada deceniului 6 al acestui veac, referitoare la structura chimică şi funcţiile acizilor nucleici, precum şi la mecanismele moleculare prin care aceşti biopolimeri programează biosinteza proteinelor, au constituit premisele pentru apariţia biologiei moleculare. Descoperirile înregistrate de biochimie şi biologia moleculară în explicarea bazei moleculare a eredităţii organismelor vii au permis izolarea şi sinteza unor gene, de asemenea introducerea în celula vie a informaţiei genetice exogene

şi exprimarea ei,ceea ce reprezintă,evident,naşterea ingineriei genetice.Aceasta a deschis posibilitatea modificării genomului bacterian în sensul sintezei de substanţe de mare utilitate practică,deşi aceste substanţe pot fi complet străine ciclului vital al bacteriilor.

Achiziţiile ştiinţifice ulterioare ale biochimiei şi biologiei moleculare au condus la conturarea unui domeniu nou,deosebit de vast,denumit biotehnologie care poate să ofere soluţii avantajoase în rezolvarea multor probleme practice de interes major. Importanţa biochimiei pentru societatea umană este determinată şi de faptul că această ştiinţă contribuie la soluţionarea unor sarcini de actualitate cu care se confruntă medicina,agricultura, zootehnia,industria alimentară,industria medico-farmaceutică etc.

Biochimia în devenirea sa este obligată multor ştiinţe înrudite şi întreţine cu ele o legătură strînsă în studierea naturii vii,dar totodată ea rămîne o ştiinţă originală şi independentă,ale cărei sarcini se concretizează în următoarele :

- cercetarea intercorelaţiei dintre structura chimică a substanţelor şi funcţiile lor ;
- studiul transformărilor suferite de substanţele chimice în organismul viu ;
- investigarea modului de generare şi stocare a energiei în sistemele vii ;
- elucidarea mecanismelor de reglare şi adaptare a proceselor biochimice în organismul viu ;
- explicarea mecanismelor moleculare de transmitere a informaţiei genetice în celula vie şi altele.

1.GLUCIDE

Glucidele,numite şi zaharide*,reprezintă din punct de vedere cantitativ,cea mai importantă clasă de substanţe organice naturale. In cantitate foarte mare glucidele se întîlnesc în plante(pînă la 80-90% din substanţa uscată a organelor vegetale).In organismele animale conţinutul glucidelor este mai redus(1-5%).

Glucidele,libere sau sub formă de derivaţi,se află în compoziţia oricărui organism viu,unde îndeplinesc rolul de sursă de energie şi rol structural(plastic),ele fiind elemente de construcţie ale celulei vii.

Toate glucidele cunoscute se subdivid în trei clase mari : monoglucide,oligoglucide şi poliglucide.

1.1.MONOGLUCIDE

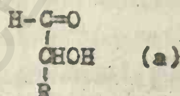
1.1.1.Nomenclatura monoglucidelor

Monoglucidele(monozaharidele sau ozele) sînt combinaţii polihidroxicarbonilice,mai exact polihidroxialdehide sau polihidroxicetone cu lanţ C-C neîntrerupt.Majoritatea monoglucidelor au formula empirică $C_nH_{2n}O_n$ în care numărul grupărilor -OH este mai mic cu o unitate decît numărul atomilor de carbon($C_nH_{n+1}(OH)_{n-1}O$).

Pentru desemnarea poziţiei substituenţilor în molecula monoglucidelor se notează atomii de carbon în aşa fel,încît grupa carbonil să fie numerotată cu cel mai mic număr.Atomii de oxigen, hidrogen etc.,uniţi cu atomul de carbon dat obţin acelaşi număr.

1.1.2.Structura monoglucidelor

Formele aldehidice şi cetonice ale monoglucidelor.Monoglucidele conţinînd în molecula lor grupa aldehidică se numesc aldoze.Dacă monoglucidele au în molecula lor grupa cetonică poartă numele de cetoze(fig.1.1).



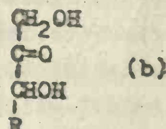


Fig.1.1.Formula generală a unei aldoze(a),respectiv a unei cetoze(b).

---

*In literatura de specialitate se mai întrebuinţează şi denumirea improprie de hidraţi de carbon(carbohidraţi).

Monoglucidele cu 3,4,5,6 şi 7 atomi de carbon se cheamă tri-
-ze,tetroze,pentoze,hexoze şi heptoze.Tabelul 1.1 redă clasifica-
-rea monoglucidelor după natura grupei carbonil şi numărul atomilor
le carbon din molecula lor.

Tabelul 1.1: Clasificarea monoglucidelor după natura grupei carbonil şi numărul atomilor de carbon

ALDOZE	Grupa carbonil	Numărul atomilor de carbon	Grupa carbonil	CETOZE
ldotrioze		3		Cetotrioze
Aldotetroze	Grupa	4	Grupa	Cetotetroze
ldopentoze	aldehidică	5	cetonică	Cetopentoze
lohexoze	(H-C=O)	6	(-C=O)	Cetohexoze
doheptoze		7		Cetoheptoze

Stereoizomeria monoglucidelor.Epimeria.Cele mai simple mono-
-icide sînt triozele.Se cunoaşte o aldotrioză,denumită aldehidă
-iceric(gliceraldehidă sau gliceroză) şi o cetotrioză - dihi-
oxiacetona(fig.1.2).Aldehida glicerică conţine un atom de carbon

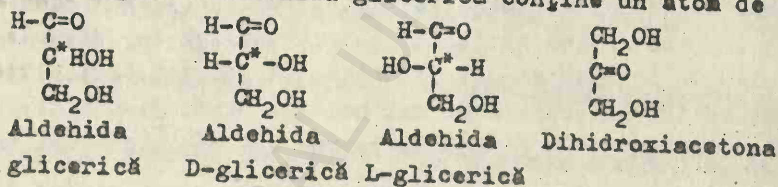


Fig.12.Structura triozelor

asimetric(C^*) şi prin urmare există două forme cu configuraţii di-
-ferite,adică doi enantiomeri: aldehida D-glicerică şi aldehida L-
glicerică(M.A.Rosanoff,1906).Toate monoglucidele(tetroze,pentoze,
hexoze etc.) care teoretic pot fi obţinute din aldehida D-gliceri-
că prin creşterea succesivă a catenei atomilor de carbon de la ca-
pătul cu grupa aldehidică,formează seria D.Monoglucidele provenite
pe aceeaşi cale din L-gliceraldehidă constituie seria L.Deci mono-
glucidele aparţin seriei D sau L dacă atomul de carbon asimetric,
cel mai îndepărtat de grupa carbonil,are aceeaşi configuraţie ca şi
atomul asimetric din aldehida D- sau L-glicerică.Marea majoritate a
monoglucidelor descoperite în natură fac parte din seria D.

Monoglucidele cu două sau mai multe centre chiralice(asimetri-

ce) în moleculă pot exista sub formă de mai mulţi diastereomeri. Pentru ilustrarea corelaţiilor stereochimice între monoglucide se folosesc formulele de proiecţie propuse de E.Fischer.In fig.1.3 şi 1.4 sînt indicate formulele structurale de proiecţie(formulele deschise) ale D-aldozelor şi D-2-cetozelor mai răspîndite,precum şi denumirea uzuală pentru fiecare monoglucidă.

D-Aldozele izomere cu importanţă din punct de vedere biologic sînt aldehida D-glicerică,D-eritroza,D-riboza,D-manoza,D-glucoza şi D-galactoza.Sub aspect biologic cele mai importante D-cetoze sînt dihidroxiacetona,D-ribuloza,D-xiluloza,D-fructoza etc.

Două monoglucide care se deosebesc numai după configuraţia unui singur atom de carbon,altul decît cel al grupei carbonil,se numesc epimeri.Aşa,D-glucoza şi D-manoza sînt epimeri în raport cu atomul C-2,iar D-ribuloza şi D-xiluloza sînt epimeri după atomul C-3.Transformarea unei aldoze sau cetoze în epimerul corespunzător este o reacţie reversibilă,cunoscută sub numele de epimerizare.

In ce priveşte activitatea optică,monoglucidele din seria D sau L pot fi D(+) sau D(-) şi L(+) sau L(-).

Formulele ciclice ale monoglucidelor.Anomeria.Formulele liniare(aciclice) sînt utile pentru compararea structurii diferitelor monoglucide,însă nu reflectă unele proprietăţi ale acestora.S-a constatat că monoglucidele,cu excepţia triozelor,tetrozelor şi probabil cetopentozelor,asemănător aldehidelor şi cetonelor,formează uşor semiacetali şi semicetali intramoleculari(ciclici).La grupa carbonil din aldoze şi cetoze se adiţionează o grupă -OH din aceeaşi moleculă,rezultînd cicluri din 5(ciclul furanozic) sau 6 atomi (ciclul piranozic) dintre care unul de oxigen.In structura rezultată astfel,grupa carbonil este mascată şi în locul ei apare o nouă grupă -OH,numită hidroxil glicozidic sau semiacetalic(semicetalic). Monoglucidele conţinînd ciclul piranozic au primit denumirea de piranoze(derivaţii lor - piranozide),iar monoglucidele avînd ciclul furanozic se denumesc furanoze (derivaţii lor - furanozide)(W.N. Haworth,1927).

Prin ciclizarea monoglucidelor apare un nou centru chiralic la atomul de carbon care a aparţinut grupei carbonil.Prezenţa acestui nou centru asimetric în molecula monoglucidelor face posibilă existenţa a doi stereoizomeri numiţi α- şi β-anomeri.

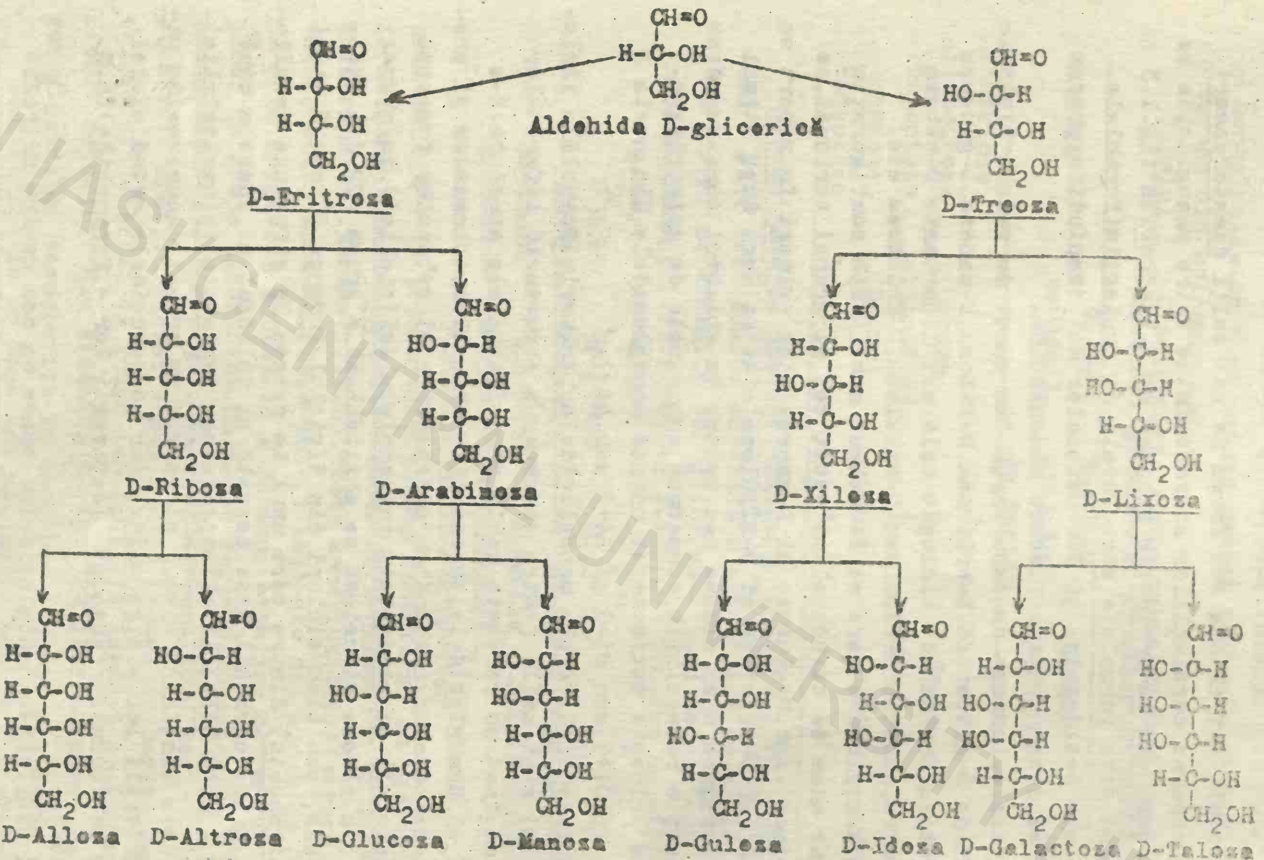


Fig.13.Relaţii stereochimice între aldozele din seria D

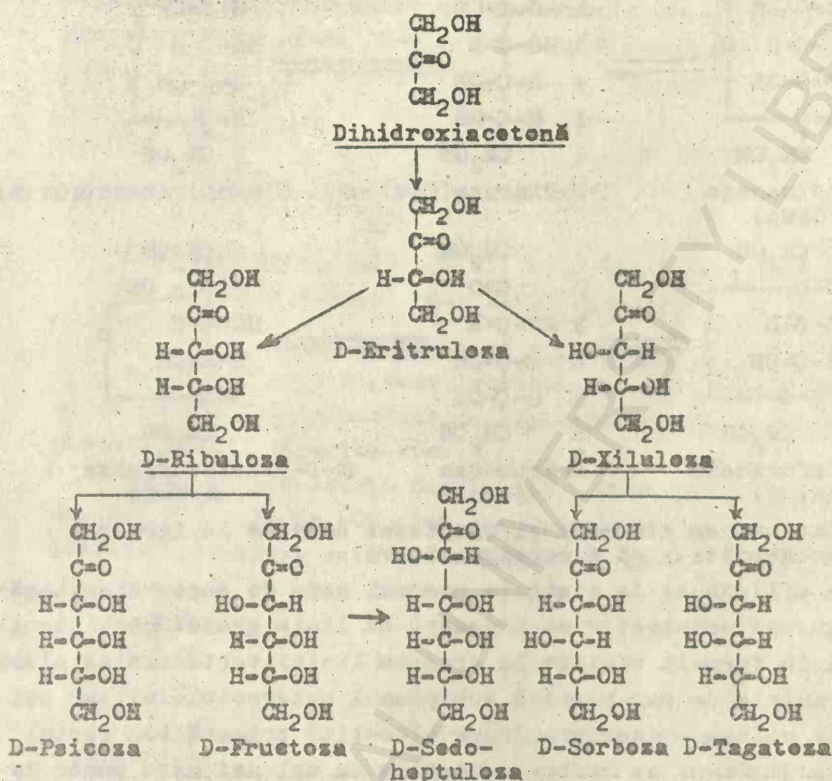


Fig.1.4.Obținerea formală a unor D-2-cetoze din dihidroxi-
acetonă.

α-Anomerul desemnează forma în care orientarea hidroxilului glicozidic este identică cu cea a hidroxilului de la atomul de carbon asimetric care determină apartenența monoglucidei respective la seria D sau L, iar β-anomerul are configurația opusă la cei doi atomi de carbon(K.Freudenberg,1932).

In conformitate cu cele de mai sus, anomerii D-glucozei și D-fructozei pot fi redați astfel(fig.1.5).

In soluție se stabilește un echilibru dinamic între cei doi anomeri și forma aciclică a monoglucidelor. Transformarea reciprocă a α-anomerilor în β-anomerii corespunzători se numește mutarotație.

Un tablou mai complet asupra stării reale a moleculelor de monoglucide se obține dacă formele ciclice se reprezintă prin formulele de perspectivă(W.N.Haworth,1929). Ciclul piranozic sau furanozic este imaginat perpendicular pe planul hîrtiei, atomul de

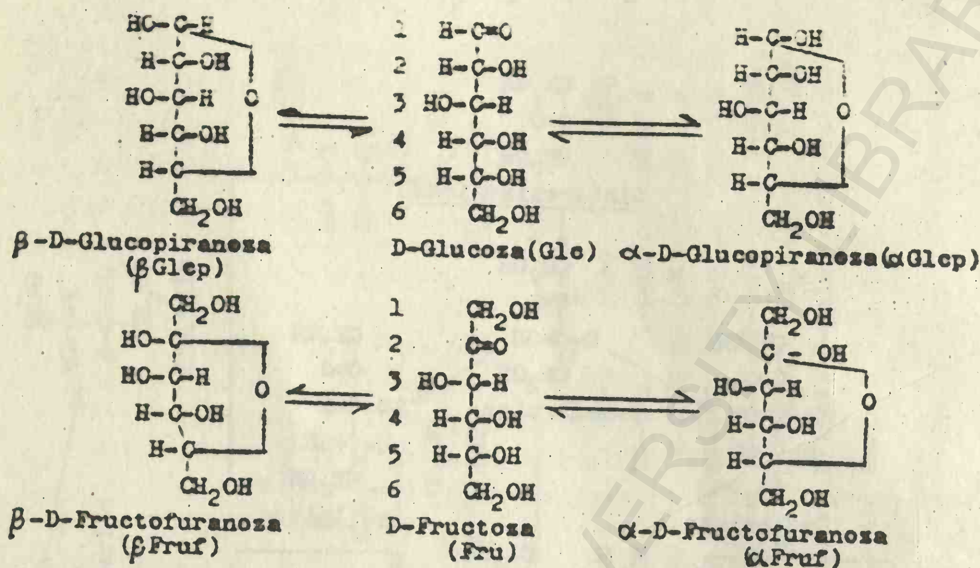


Fig.1.5.Ciclizarea glucozei şi fructozei conduce la formarea anomerilor α şi β corespunzători.

de oxigen aflîndu-se la distanţa cea mai mare de observator.Legăturile dinspre observator se trasează cu linie grasă.Substituenţii orientaţi în formele ciclice la dreapta liniei verticale se plasează în formulele de perspectivă sub planul heterociclului,iar cei dispuşi la stînga - deasupra.Grupa alcoolică primară sau restul catenei de la atomul de carbon asimetric cu cel mai mare număr de ordine din ciclul piranozic,respectiv furanozic se trece deasupra planului moleculei,dacă atomul menţionat are configuraţie D şi sub acest plan în cazul atomului cu configuraţia L.Aceeaşi regulă se aplică şi pentru grupa alcoolică primară legată la C-2 în piranozele sau furanozele provenite din cetoze(fig.1.6).

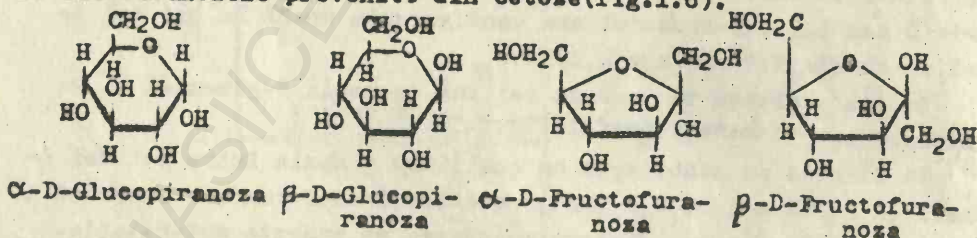
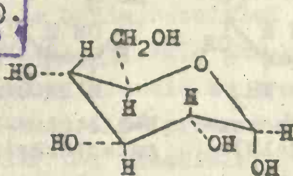
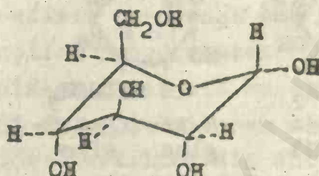


Fig.1.6.Formulele de perspectivă ale D-glucopiranozei şi D-fructofuranozei.

Atomii heterociclului piranozic nu se află în acelaşi plan.

Obişnuit, D-aldopiranozele au conformaţia scaun normală(Cl) în care grupele -OH la atomii C-2 - C-4 adoptă o poziţie ecuatorială(fig. 1.7).





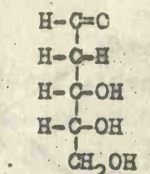
Conformer normal(Cl) Conformer alternativ(1C)

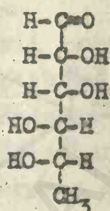
Fig.1.7. Conformaţia scaun a α-D-glucozei.

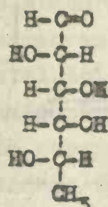
1.1.3. Derivaţi ai monoglucidelor

Mulţi derivaţi ai monoglucidelor se întîlnesc în natură. Intre ei se numără deoxiglucidele, aminoglucidele, acizii aldonici, acizii uronici, acizii aldarici etc.

Deoxiglucide. Aceste combinaţii includ monoglucide în care una sau mai multe grupe -OH sînt substituite cu atomul de hidrogen(fig. 1.8). 2-Deoxiriboza este un component al deoxinucleotidelor din ADN.







D-2-Deoxiriboza L-Ramnoza(Rha) L-Fucoza(Fuc)

Fig.1.8. Structura unor deoxiglucide.

L-Ramnoza(6-deoxi-L-Manoza) şi L-fucoza(6-deoxi-L-galactoza) se raportează la puţinele monoglucide din seria L, descoperite în plante şi animale.

Aminoglucide. Ele reprezintă monoglucide în care o grupă -OH s-a înlocuit cu grupa $-NH_2$. Larg răspîndite în natură sînt 2-amino-2-deoxialdozele, ca de exemplu, glucozamina(2-amino-2deoxiglucoza) şi galactozamina(2-amino-2-deoxigalactoza) care de obicei se întîlnesc sub formă de derivaţi N-acetilaţi(fig.1.9) în compoziţia glicoproteinelor şi glicolipidelor.

O clasă importantă de aminoglucide cu structură mai complexă formează acizii sialici. Aceştia sînt derivaţi acilaţi ai acidului 2-ceto-3,5-dideoxi-5-aminononoic, numit acid neuraminic a cărui

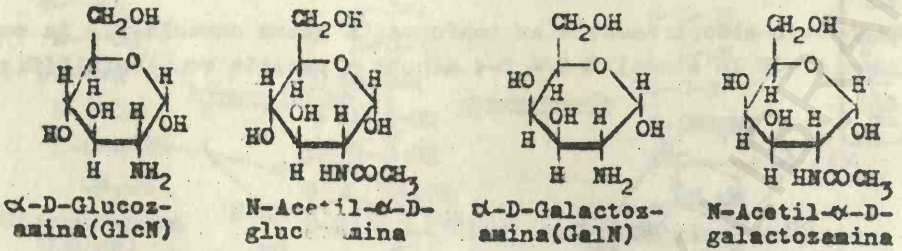


Fig.1.9.Formulele de perspectivă ale unor aminoglucide.

structură poate fi exprimată în trei moduri(fig.1.10).Acizii sialici pot fi derivaţii N-acetil- sau N-glicolil-($-COCH_2OH$) ai acidului neuraminic.Acizii sialici sînt larg răspîndiţi în bacterii şi ţesuturile animale,fiind componenţi ai poliglucidelor,glicoproteinelor şi glicolipidelor.Ei îndeplinesc funcţii mecanice, imunochimice etc.

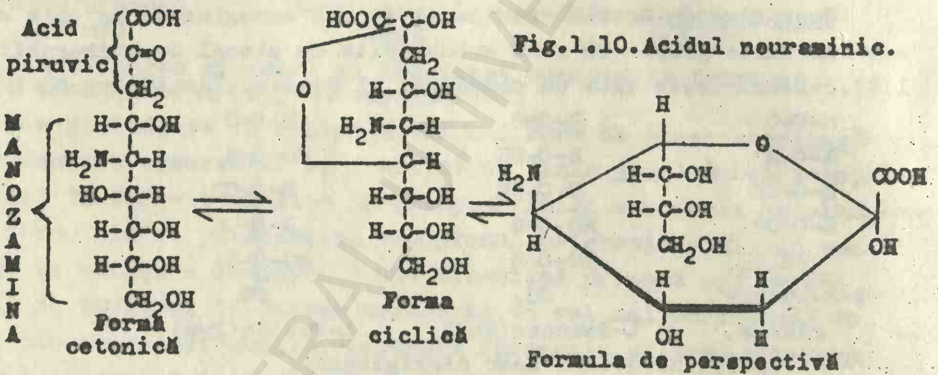


Fig.1.10.Acidul neuraminic.

Un alt derivat important al D-glucozaminei este <u>acidul muramic</u>(fig.1.11) conţinut în pereţii celulari ai bacteriilor,algelor albastre,de asemenea,în rickettsii.

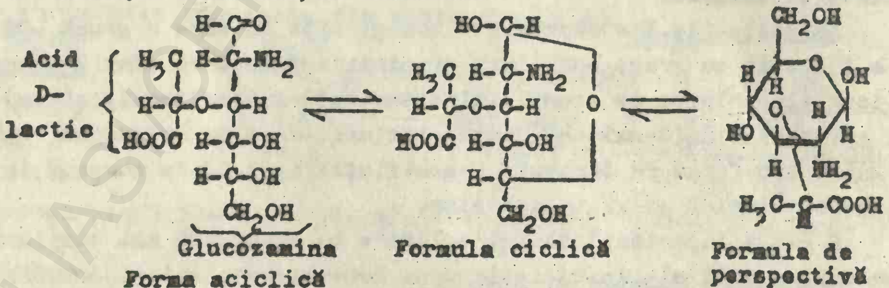


Fig.1.11.Structura acidului muramic [3-O-(α-carboxietil)-D-glucozamina].

Acizi derivaţi din monoglucide. Grupa aldehidică din aldoze se poate oxida, rezultînd hidroxi-acizii cunoscuţi sub numele de acizi aldonici. Prin aceasta se explică proprietatea reducătoare a aldozelor. Aldozele cu grupa aldehidică protejată se oxidează la grupa alcoolică primară, dînd acizi uronici. Oxidarea simultană a grupelor C-1 aldehidică şi C-6 hidroximetilică din aldoze conduce la obţinerea acizilor aldarici (zaharici). Exemplificăm cele spuse cu acizii obţinuţi din glucoză (fig.1.12). Combinaţiile obţinute prin

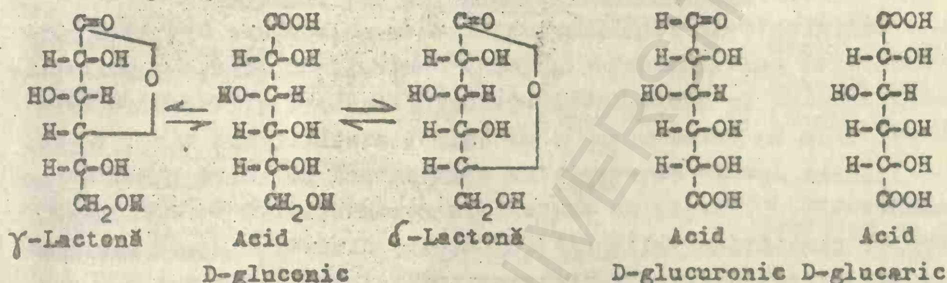


Fig.1.12. Acizii rezultaţi prin oxidarea D-glucozei.

oxidarea aldozelor constituie acizi puternici. Acidul gluconic se foloseşte pentru introducerea Ca^{++} în organismul uman.

Glicozide. Glicozidele iau naştere prin substituirea hidroxilului glicozidic din formele ciclice ale aldozelor şi cetozelor cu alcooli, fenoli, amine etc. In funcţie de natura heteroatomului prin care se leagă cele două componente se disting O-glicozide, N-glicozide şi S-glicozide. Fragmentul de monoglucidă din molecula glicozidei se numeşte rest glicozilic sau glicon, iar cealaltă componentă - aglicon. Legătura dintre glicon şi aglicon se numeşte legătură glicozidică. Aceasta este tipul principal de legătură pentru toate combinaţiile naturale conţinînd glucide (oligoglucide, poliglucide, glicoproteine, glicolipide, nucleotide etc.).

Multe glicozide au utilizări practice, însă un număr mare de glicozide posedă acţiune toxică asupra omului şi animalelor.

1.2. OLIGOGLUCIDE (OLIGOZAHARIDE SAU OLIGOZIDE)

Oligoglucidele cuprind combinaţii alcătuite din 2-10 resturi de monoglucide unite prin legături O-glicozidice.

Oligoglucidele, în care legăturile glicozidice se realizează între hidroxilul glicozidic al unei monoglucide şi un hidroxil alcoolic din altă monoglucidă, se numesc oligoglucide reducătoare.

Ca exemple de asemenea oligoglucide putem da maltoza,izomaltoza, lactoza,celobioza etc.

Dacă legătura glicozidică se stabileşte între hidroxilii glicozidici ai resturilor de monoglucide rezultă oligoglucide nereducătoare.Reprezentanţi ipici ai acestor oligoglucide sînt zaharoza,trehaloza,rafinoza ahioza etc.

Pentru metabolismul plantelor şi animalelor au importanţă mare unele diglucide,triglucide şi tetraglucide(tabelul 1.2).

1.3.POLIGLUCIDE(POLIZAHARIDE SAU POLIOZIDE)

Poliglucidele sînt combinaţii macromoleculare obţinute prin condensarea monoglucidelor şi(sau) derivaţilor acestora.Unităţile monoglucidice se unesc între ele prin legături glicozidice,care se pot afla în forma α sau β şi se pot stabili după tipul 1⟶2, 1⟶3,1⟶4 sau 1⟶6,rezultînd o structură polimeră liniară sau ramificată.In funcţie de compoziţia monoglucidică se deosebesc homopoliglucide(homoglicani*) alcătuite dintr-o singură monoglucidă şi heteropoliglucide(heteroglicani*) conţinînd 2-4,mai rar 5-6 monoglucide diferite.

După provenienţă,poliglucidele se împart în fitopoliglucide, poliglucidele microorganismelor şi zoopoliglucide.

1.3.1.Homopoliglucide(homoglicani)

Există homoglicani neutri(alcătuiţi din resturi de monoglucide neutre),bazici(din resturi de aminoglucide) şi acizi(constituiţi din resturi de monoglucide acide).Lanţurile poliglicozidice ale homopoliglucidelor pot fi liniare sau ramificate.

1.3.1.1.Celuloza.Este cea mai răspîndită substanţă organică naturală,căreia la plante îi revin 50% şi mai mult din cantitatea de carbon.Celuloza este o poliglucidă predominant vegetală,însă sa se găseşte şi la unele bacterii şi nevertebrate(Tunicata).

Hidroliza completă a celulozei conduce la obţinerea cantitativă a β-D-glucozei,iar hidroliza parţială dă diglucida celobioza. Aceste date şi alte cercetări chimice au arătat că celuloza reprezintă un polimer liniar alcătuit din resturi de β-D-glucopiranoză, unite prin legături β-1,4-glicozidice(fig.1.13).Numărul resturilor de glucoză în molecula celulozei n≥3000,ceea ce corespunde la o masă moleculară de peste 400.000 daltoni(D)**.Celuloza nu este so-

*In conformitate cu noua nomenclatură
**1 dalton(D)=masa unui atom de hidrogen=$1,67.10^{-24}$g

Tabelul 1.2. Exemple de di-, tri- şi tetra-zaharide.

Denumirea uzuală şi sistematică	Formula structurală	Răspîndire în natură
CELOBIOZA [O-β-D-Glucopiranozil-(1→4)-β-D-glucopiranoza]		Se formează prin hidroliza celulozei.
α-MALTOZA [O-α-D-Glucopiranozil-(1→4)-α-D-glucopiranoza]		În cantitate mică se găseşte sub formă liberă în plante.
α-LACTOZA [O-β-D-Galactopiranozil-(1→4)-α-D-glucopiranoza]		Este un constituent al laptelui. Se descoperă în urină în timpul sarcinii. In plante apare rar.
TREHALOZA [O-α-D-Glucopiranozil-(1→1)-α-D-glucopiranozida]		Se găseşte în ciuperci şi drojdii. Este glucida majoră din hemolimfa insectelor.
ZAHAROZA (Sucroza) [O-α-D-Glucopiranozil-(1→2)-β-D-fructofuranozida]		Are cea mai largă răspîndire în plante: trestia de zahăr, sfeclă, sorg, ananas, morcov. Deţine rol în transportul glucidelor la plante.
RAFINOZA		Se întîlneşte în plante: sfeclă, seminţele de bumbac, embrionii seminţelor de cereale etc. Serveşte ca formă de transport a glucidelor.
STAHIOZA		Se întîlneşte în boabele de leguminoase, mana frasinului şi în rădăcinele de *Stachis tuberifera*.

lubilă în apă,însă se dizolvă în soluţiile amoniacale ale sărurilor de cupru.

Celuloza are rol structural în organismele vegetale.Moleculele de celuloză formează microfibre care împreună cu alte polizaharide(hemiceluloze,substanţe pectice) şi lignina(polimer format din alcooli aromatici) intră în structura peretelui celular al plantelor,conferindu-i rezistenţă la presiunea interioară a apei şi la susţinerea unei mari greutăţi.

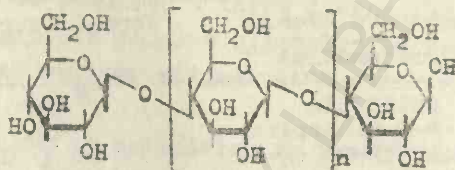


Fig.1.13.Structura celulozei.

Deşi celuloza se află în toate plantele,conţinutul ei variază puternic la diferite specii şi organe vegetale.Astfel,celuloza se găseşte în bumbac în proporţie de 98%,în in 80-90%,esenţele răşinoase 60% şi în cele foioase 40-50%.

1.3.1.2.<u>Amidonul</u>.Amidonul este principala polizaharidă de rezervă a plantelor.El se depozitează în seminţe,bulbi,tuberculi etc., în granule cu formă şi dimensiuni caracteristice pentru fiecare specie de plante.

Prin hidroliza completă a amidonului rezultă α-D-glucopiranoza.Amidonul constituie un amestec de două poliglucide.Una,numită <u>amiloză</u>,reprezintă un polimer liniar alcătuit din resturi de α-D-glucopiranoză,unite unul cu altul prin legături α-1,4-glicozidice(fig.1.14a).Molecula amilozei este dispusă în spaţiu sub formă de spirală(fig.1.14c),fiecare spiră cuprinzînd 6 resturi de glucoză.A doua poliglucidă componentă a amidonului se numeşte <u>amilopectină</u> şi are o structură puternic ramificată.Resturile de glucoză în amilopectină se unesc predominant prin legături α-1,4-glicozidice,iar în punctele de ramificaţie există legături α-1,6-glicozidice(fig.1.14b).O ramificaţie se întîlneşte la fiecare 24-30 resturi de glucoză.

Amiloza şi amilopectina se deosebesc după proprietăţile lor fizice şi chimice.Masa moleculară medie a amilozei din cartof este circa 400.000,din porumb şi orez - între 100.000 şi 200.000.Pentru amilopectina s-au stabilit mase moleculare mai mari de 20.10^6.Amiloza se colorează cu iodul în albastru închis,iar amilopectina în albastru-violet.Amiloza prin dizolvare în apă fierbinte dă o solu-

ţie coloidală,limpede,nevîscoasă,iar amilopectina formează aşa-numitul „clei de amidon".

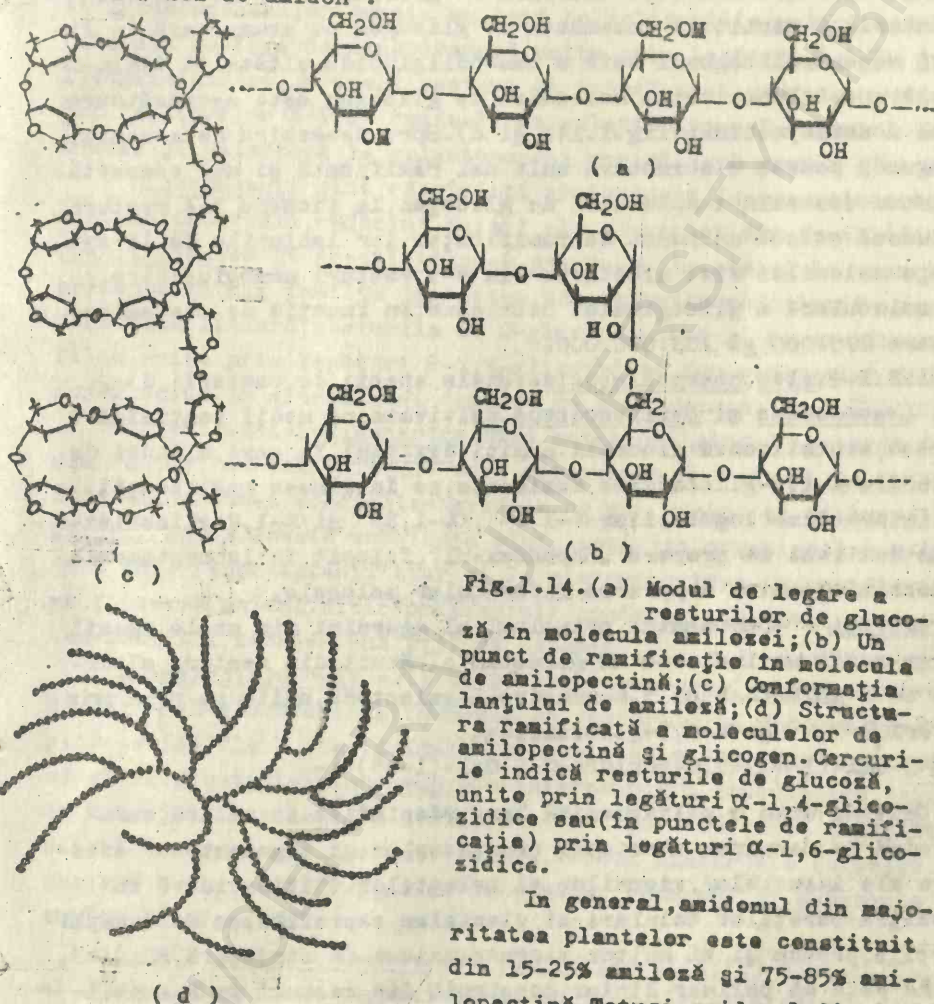


Fig.1.14.(a) Modul de legare a resturilor de glucoză în molecula amilozei;(b) Un punct de ramificaţie în molecula de amilopectină;(c) Conformaţia lanţului de amiloză;(d) Structura ramificată a moleculelor de amilopectină şi glicogen.Cercurile indică resturile de glucoză, unite prin legături α-1,4-glicozidice sau(în punctele de ramificaţie) prin legături α-1,6-glicozidice.

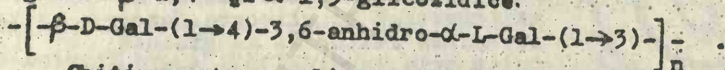
In general,amidonul din majoritatea plantelor este constituit din 15-25% amiloză şi 75-85% amilopectină.Totuşi,amidonul din boabele de porumb ceros conţine practic numai amilopectină,în timp ce unii hibrizi de porumb au 50-80% amiloză.Amidonul are un rol însemnat în alimentaţia omului şi animalelor.

In plantele superioare,îndeosebi,aparţinînd familiiler Compositae,Liliaceae şi Gramineae se întîlnesc ca poliglucide de rezervă polimeri ai D-fructozei(inulina,fleina) etc.

1.3.1.3.Glicogenul.Este cea mai importantă poliglucidă de rezervă din organismele animale.De asemenea se găsește în unele drojdii și bacterii.O cantitate însemnată de glicogen se acumulează în ficat și mușchi.Glicogenul este o homopoliglucidă alcătuită din α-D-glucopiranoză.Constituția moleculei de glicogen este asemănătoare cu cea a amilopectinei(fig.1.14b și d).Spre deosebire de aceasta, glicogenul posedă o structură mult mai ramificată și mai compactă. In partea centrală a moleculei de glicogen,la fiecare 3-4 resturi de glucoză există un punct de ramificație,iar lanțurile de la suprafața moleculei sînt alcătuite din 6-9 resturi monoglucidice. Masa moleculară a glicogenului oscilează,în funcție de proveniență,între 270.000 și 100.000.000.

1.3.1.4.Alte homopoliglucide.Unele specii de bacterii din genul Leuconostoc și Streptococcus,cultivate pe medii conținînd zaharoză,sintetizează glucanii numiți dextrani,în care,alături de legăturile α-1,6-glicozidice dominante,se întîlnesc ramificații prin intermediul legăturilor α-1,4- , α-1,3- și α-1,2-glicozidice.Din dextrani se prepară „Sephadex-ul",folosit în laboratoarele de biochimie pentru separarea diferitelor molecule.

Agaroza - componentul principal al agarului din unele specii de alge roșii marine,este un galactan alcătuit din resturi alternante de D-galactoză și 3,6-anhidro-L-galactoză,unite pe rînd prin legături β-1,4- și α-1,3-glicozidice:



$$-\left[-\beta\text{-D-Gal-}(1\rightarrow4)\text{-3,6-anhidro-}\alpha\text{-L-Gal-}(1\rightarrow3)-\right]_n .$$

Chitina este o polizaharidă larg răspîndită în natură,care participă la formarea carapacei crustaceelor și tegumentelor exterioare ale insectelor,viermilor și moluștelor.Chitina intră în compoziția pereților celulari ai plantelor saprofite,ca de exemplu ciupercile,precum și ai multor microorganisme.Ca structură chimică, chitina este un polimer liniar,construit din resturi de N-acetil-β-D-glucozamină,unite prin legături β-1,4-glicozidice.

1.3.2.Heteropoliglucide(heteroglicani)

1.3.2.1.Galacto- și glucomanani.Galactomananii și glucomananii sînt heteropoliglucide de rezervă,al căror conținut poate atinge 30-34% în semințele și rizomii plantelor.Aceste substanțe există alături cu amidonul sau uneori ca glucide de rezervă unice.

Galactomananii se găsesc în cantitate însemnată în endosper-

mul semințelor de leguminoase,în cantități mai mici în semințele plantelor din familiile Palmaceae și Rubiaceae.Mulți reprezentanți ai galactomananilor conțin un lanț poliglicozidic principal alcătuit din resturi de manopiranoză,unite prin legături β-1,3- și β-1,4-glicozidice;la unele resturi de manoză sînt grefate cu ajutorul legăturilor α-1,6- radicali de galactopiranoză.Raportul între manoză și galactoză în galactomanani variază după specia plantelor.

Glucomananii sînt răspîndiți predominant în organele subpămîntene(tuberculi,rădăcini,bulbi) ale plantelor din familiile Araceae,Liliaceae și Amazillidaceae,precum și în semințele unor reprezentanți din familia Iridaceae.Aceste heteropoliglucide posedă structură liniară,resturile de D-glucopiranoză și D-manopiranoză fiind unite prin legături β-1,4-glicozidice.Raportul celor două monoglucide în glucomanani depinde de proveniența lor.

1.3.2.2.Mucopolizaharide.Sînt heteropoliglucide constituite din resturi de aminoglucide care alternează cu resturi de acizi uronici.De aceea mucopolizaharidele se mai numesc și glicozaminoglicani acizi.Aceste substanțe sînt specifice organismului animal, însă unii reprezentanți apar și la microorganisme.Ca exemple se menționează: acidul hialuronic,acizii condroitinsulfurici,dermatan-sulfatul,keratan-sulfații și heparina.

Acidul hialuronic este un polimer neomogen în care resturile de acid β-D-glucuronic alternează cu resturile de N-acetil-β-D-glucozamină(fig.1.15a).Acidul hialuronic este constituentul principal al substanței fundamentale intercelulare,îndeplinind rolul de material de cimentare a diferitelor tipuri de țesut conjunctiv. Datorită structurii macromoleculare,acidul hialuronic formează o barieră contra infiltrațiilor de germeni patogeni și substanțe toxice în organism.

Acizii condroitinsulfurici(condroitinsulfații) sînt sulfați ai condroitinei,care reprezintă un polimer liniar,alcătuit din acid β-D-glucuronic și N-acetil-β-D-galactozamina.In funcție de poziția acidului sulfuric din N-acetilgalactozamină se deosebesc acidul condroitin-4-sulfuric(condroitinsulfatul A) și acidul condroitin-6-sulfuric sau condroitinsulfatul C(fig.1.15b).Acizii condroitinsulfurici sînt larg răspîndiți în cartilaje,tendoane,oase etc.,unde formează complecși cu proteinele.

a) Acid hialuronic

b) Condroitina: R_1 şi R_2 = -H

Acid condroitin-4-sulfuric: R_1 = $-SO_3H$ şi R_2 = -H

Acid condroitin-6-sulfuric: R_1 = -H şi R_2 = $-SO_3H$

c) Dermatan-sulfat

d) Keratansulfat I

e) Heparina

Fig.1.15. Structura unor mucopolizaharide din organismul animal.

Dermatan-sulfatul (condroitinsulfatul B) are molecula formată din N-acetil-β-D-galactozamină esterificată cu acid sulfuric la C-4 şi acid α-L-iduronic (fig.1.15c). Poate să conţină şi cantităţi mici de acid D-glucuronic. Dermatansulfatul a fost descoperit în piele, tendoane, pereţii vaselor sanguine etc.

Keratan-sulfaţii sînt constituiţi din β-D-galactopiranoză şi

N-acetil-β-D-glucozamin-6-sulfat(keratan-sulfat I)(fig.1.15d) sau N-acetil-β-D-galactozamin-6-sulfat(keratan-sulfat II).Keratan-sulfatul I a fost izolat din cornee,iar keratan-sulfatul II din cartilaje,oase.

<u>Heparina</u> este secretată în sînge de celulele adipoase ale ficatului,plămînilor,muşchilor etc.In structura heparinei s-au descoperit acidul α-D-glucuronic esterificat cu H_2SO_4 la C-2 şi N-sulfo-α-D-glucozamin-6-sulfat(fig.1.15e).Această structură nu poate fi considerată ca definitiv stabilită.Heparina posedă o acţiune biologică specifică,prin faptul că este un puternic anticoagulant.

Catenele poliglucidice ale glicozaminoglicanilor sulfataţi adoptă o structură spiralată.

1.3.2.3.<u>Biopolimeri micşti,conţinînd glucide</u>.Prin hidroliza acestor substanţe alături cu monoglucidele se formează molecule aparţinînd alter clase de combinaţii chimice.

<u>Acizii teichoici</u> sînt conţinuţi în pereţii celulari ai bacteriilor Gram-pozitive în cantităţi ce pot ajunge la 50% din masa lor uscată.Scheletul moleculei de acizi teichoici este un polimer în care alternează resturile unui alcool polihidroxilic(ribitol sau glicerol) şi ale acidului fosforic;la resturile de alcool polihidroxilic se grefează prin legături glicozidice resturi de monoglucide şi prin legături esterice - radicali de aminoacizi(fig.1.16).

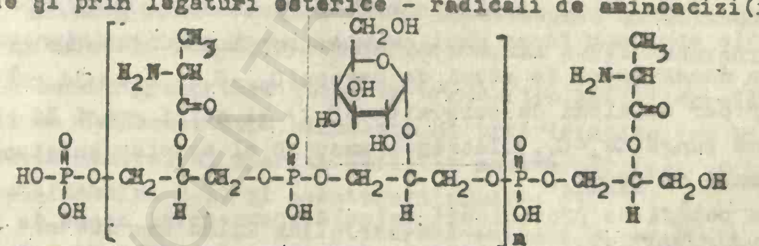


Fig.1.16.Structura acidului teichoic la unul din reprezentanţii genului <u>Lactobacillus</u>.

Acizii teichoici determină multe proprietăţi biologice specifice microorganismelor respective.

<u>Peptidoglicanii peretelui celular</u> al bacteriilor au la baza moleculei lor un glican construit din cantităţi echimoleculare de N-acetil-β-D-glucozamină şi acid N-acetil-β-D-muramic care se unesc prin legături β-1,4-glicozidice.La gruparea carboxil a acidului N-acetil-muramic se ataşează o peptidă cu compoziţie variabilă.

2. LIPIDE

Lipidele sînt substanţe organice larg răspîndite în organismele animale, plante şi microorganisme unde servesc ca surse de energie şi componenţi ai membranelor biologice.

Compoziţia şi structura chimică a lipidelor se disting printr-o mare heterogenitate. In majoritatea cazurilor, lipidele cuprind substanţe <u>amfifile</u> conţinînd atît grupe hidrofile polare sau ionice cît şi grupe hidrofobe nepolare. Natura acestor grupe determină într-un grad însemnat proprietăţile fizice, chimice şi biologice ale lipidelor. Astfel, lipidele sînt insolubile în apă, însă se dizolvă în solvenţi organici nepolari (benzen, cloroform, eter etilic etc.). Lipidele amfifilice de obicei se întîlnesc în membranele celulare.

Toate lipidele pot fi împărţite în două grupe mari: lipide simple şi lipide complexe. Lipidele simple sînt combinaţii naturale de tip esteric ale acizilor graşi cu diferiţi alcooli. In grupa lipidelor simple intră ceridele, acilglicerolii şi steridele. Din grupa lipidelor complexe fac parte fosfolipidele şi glicolipidele.

2.1. CERIDE

Ceridele sînt esteri ai acizilor graşi superiori ($C_{24}-C_{32}$) cu alcooli superiori monovalenţi ($C_{14}-C_{30}$). Majoritatea ceridelor aparţin derivaţilor alcoolilor alifatici şi au următoarea structură generală: $R_1-CH_2-O-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-CH_2-R_2$, unde R_1 - radicalul alcoolului alifatic şi R_2 - radicalul acidului gras. In natură, ceridele apar sub forma unui amestec conţinînd hidrocarburi (n-alcani) cu număr impar de atomi de carbon ($C_{21}-C_{37}$), alcooli primari cu număr par de atomi de carbon ($C_{22}-C_{32}$) şi acizi graşi liberi cu catenă lungă ($C_{14}-C_{34}$). Intregul amestec al acestor substanţe poartă numele de <u>ceruri</u>.

Cerurile pot fi de provenienţă animală (spermacetul, ceara de albine, lanolina) sau vegetală (ceara de Carnauba). Cerurile formează un strat protector pe pielea, părul şi penele animalelor, de asemenea, pe frunzele, florile şi fructele diferitelor plante.

2.2. ACILGLICEROLI* (GRASIMI NEUTRE SAU GLICERIDE)

Acilglicerolii sînt cele mai răspîndite lipide în ţesuturile plantelor şi animalelor. In organismul viu se găsesc acilgliceroli

*In conformitate cu terminologia standardizată curentă.

combinaţi cu proteinele sau glucidele,formînd componenţii structurali ai membranelor celulare şi acilgliceroli de rezervă,avînd rol energetic.Acilglicerolii de rezervă se depun în ţesutul subcutant al organismului animal şi în seminţele sau fructele plantelor, variind cantitativ cu specia.

2.2.1.<u>Structura</u> <u>acilglicerolilor</u>.Acilglicerolii reprezintă esteri ai acizilor graşi cu glicerolul(glicerina sau propantriolul). Intrucît glicerolul este un alcool trihidroxilic,se deosebesc monoacilgliceroli(monogliceride),diacilgliceroli(digliceride) şi triacilgliceroli(trigliceride),a căror formule structurale generale sînt prezentate în fig.2.1.Monoacilglicerolii şi diacilglicerolii

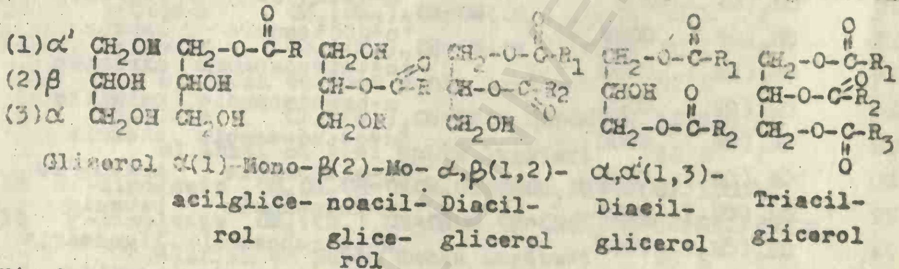


Fig.2.1.Structura glicerolului,mono-,di- şi tri-acilglicerolilor.

nu se întîlnesc în organismele vii în cantităţi apreciabile,deşi ei constituie importanţi produşi intermediari ai metabolismului substanţelor.Triacilglicerolii au cea mai largă răspîndire în natură.

Acizii graşi care intră în compoziţia acilglicerolilor naturali se deosebesc după structura şi proprietăţile lor fizico-chimice.In general ei aparţin acizilor monocarboxilici şi pot fi saturaţi(tabelul 2.1) şi nesaturaţi(tabel 2.2).

In cei mai mulţi acilgliceroli animali şi vegetali predomină acizii graşi cu 16-18 atomi de carbon.Acilglicerolii,în compoziţia cărora intră acelaşi acid gras sînt <u>simpli</u> şi se denumesc după acidul gras corespunzător,de exemplu,tripalmitoilglicerol etc.Dacă radicalii de acizi graşi sînt diferiţi,atunci acilglicerolii se numesc <u>micşti</u>.In sursele naturale predomină triacilglicerolii micşti.Compoziţia în acizi graşi a triacilglicerolilor şi raporturile cantitative între diferiţi acilgliceroli se modifică de la o specie la altă specie de animale şi plante.

Tabelul 2.1. Principalii acizi graşi saturaţi

Numărul atomilor de carbon	Formula structurală	Denumirea acidului gras: sistematică	Denumirea acidului gras: obişnuită
	a) Acizi cu catenă normală		
2	CH_3COOH	Acid etanoic	Acid acetic
3	CH_3CH_2COOH	propanoic	propionic
4	$CH_3(CH_2)_2COOH$	butanoic	butiric
6	$CH_3(CH_2)_4COOH$	n-hexanoic	caproic
8	$CH_3(CH_2)_6COOH$	n-octanoic	caprilic
10	$CH_3(CH_2)_8COOH$	n-decanoic	caprinic
12	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	n-dodecanoic	lauric
14	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	n-tetradecanoic	miristic
16	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	n-hexadecanoic	palmitic
18	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	n-octadecanoic	stearic
20	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	n-eicosanoic	arachidic
22	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$	n-docosanoic	behenic
24	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	n-tetracosanoic	lignoceric
26	$CH_3(CH_2)_{24}COOH$	n-hexacosanoic	cerotic
28	$CH_3(CH_2)_{26}COOH$	n-octacosanoic	montanic
30	$CH_3(CH_2)_{28}COOH$	n-tricontanoic	melisic
	b) Acizi cu catenă ramificată		
4	$CH_3-CH(CH_3)-COOH$		izobutiric
5	$CH_3-CH(CH_3)-CH_2-COOH$		izo-valerianic
19	$CH_3(CH_2)_7-CH(CH_3)-(CH_2)_8-COOH$		tuberculo-stearic
	c) Hidroxiacizi		
18	$CH_3(CH_2)_7-CH(OH)-CH(OH)-(CH_2)_7COOH$		9,10-dihidroxistearic
24	$CH_3(CH_2)_{21}-CH(OH)-COOH$	α-hidroxi-lignoceric	cerebronic

2.2.2. Proprietăţile fizice şi chimice ale acilglicerolilor.
Acilglicerolii sînt amfifili slabi, întrucît legăturile esterice, de

Tabelul 2.2. Principalii acizi g ași nesaturați

Numărul atomilor de carbon	Denumirea obișnuită a acidului gras	Structura chimică
	a) Acizi cu o dublă legătură	
4	crotonic	CH_3-CH=CH-COOH (Radical crotonil)
16	palmitoleic	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7COOH$
18	oleic	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$ (Radical oleil)
18	vaccenic	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_9COOH$ (trans)
18	petroselic	$CH_3(CH_2)_{10}-CH=CH-(CH_2)_4COOH$ (trans)
22	erucic	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{11}COOH$
24	nervonic	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{13}COOH$
	b) Acizi cu două duble legături	
18	linoleic	$CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$
	c) Acizi cu trei duble legături	
18	α-linolenic	$CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$
18	γ-linolenic	$CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_4COOH$
	d) Acizi cu patru duble legături	
20	arachidonic	$CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_4CH_2CH_2COOH$
	e) Acizi cu triplă legătură	
18	tariric	$CH_3(CH_2)_{10}C\equiv C(CH_2)_4COOH$
	f) Hidroxiacizi nesaturați	
18	ricinoleic	$CH_3(CH_2)_5-CH(OH)-CH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$
24	hidroxinervonic	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{12}-CH(OH)-COOH$

asemenea, grupele -OH libere în mono- și di-acilglicerol se află neionizate și slab polarizate. De aceea, proprietățile acestor substanțe se corelează îndeosebi cu existența în moleculele lor a grupelor alchilice hidrofobe. Astfel, acilglicerolii animali care de obicei conțin acizi grași saturați (acid palmitic, stearic etc.) sînt solizi sau semisolizi la temperatura camerei, denumindu-se <u>grăsimi</u>. Acilglicerolii vegetali, în care predomină acizii grași nesaturați, sînt lichizi la temperatura camerei și se mai numesc <u>uleiuri</u>. Pe lîngă acilgliceroli, grăsimile și uleiurile naturale conțin cantități mici de alte lipide.

Acilglicerolii sînt insolubili în apă,dar foarte solubili în solvenţi organici nepolari.

Ca esteri,acilglicerolii pot fi hidrolizaţi prin fierbere cu acizi sau baze.Hidroliza acilglicerolilor sub acţiunea hidroxizilor alcalini se numeşte saponificare.Ionii carboxilaţi($R-COO^-$) eliberaţi în urma acestei reacţii formează cu cationii sărurile corespunzătoare($R-COOMe$) numite săpunuri.Cantitatea în mg de KOH necesară pentru saponificarea unui gram de triacilglicerol se numeşte indice de saponificare(IS).IS caracterizează,cu aproximaţie, masa moleculară a triacilglicerolilor,respectiv a acizilor graşi din compoziţia lor.Un IS mare dovedeşte prezenţa unor acizi graşi cu masă moleculară mică.Astfel,untul are IS=210-240,iar la uleiul de rapiţă IS=172-174.Cunoscînd IS se poate stabili provenienţa unui acilglicerol natural.

Deosebit de importante sînt reacţiile de adiţie la dublele legături din moleculele acilglicerolilor.Prin hidrogenare,uleiurile vegetale se solidifică,proces folosit la prepararea margarinei.Cantitatea de I_2 sau Br_2 în grame,adiţionată la dublele legături ale acizilor graşi din 100 g acilglicerol se numeşte indice de iod(II).Un II ridicat arată că în compoziţia acilglicerolului respectiv predomină acizii graşi nesaturaţi.Numărul de legături duble şi lungimea catenelor de acizi graşi din lipide influenţează fluiditatea membranelor celulare la procariote.

Acilglicerolii naturali păstraţi,în contact cu aerul şi cu lumina,dobîndesc un gust iute şi un miros specific neplăcut.Acest proces,cunoscut sub numele de rîncezire este nedorit,mai ales în industria alimentară.Rîncezirea acilglicerolilor se poate datora acţiunii umidităţii şi oxigenului,conducînd la cetone şi aldehide cu miros caracteristic neplăcut.

2.3.STERIDE

Steridele sînt esteri ai acizilor graşi superiori cu alcoolii tetraciclici monohidroxilici numiţi steroli.

Intre acizii graşi identificaţi în steride se numără acizii palmitic,stearic,oleic,linoleic şi linolenic.

Sterolii fac parte din clasa steroidelor,substanţe larg răspîndite în natură.Acestei clase mai aparţin hormonii sexuali,hormonii corticosuprarenalei,acizii biliari,agliconii glicozidelor

cardiotonice şi saponinelor vegetale etc.

2.3.1. <u>Unele</u> <u>aspecte</u> <u>privind</u> <u>stereochimia</u> <u>steroidelor</u>. La baza structurii steroidelor se află scheletul tetraciclic al 1,2-<u>ciclopentanperhidrofenantrenului</u>, hidrocarbură saturată numită şi <u>steran</u> (fig.2.2). Inelele în steroide sînt notate cu A,B,C,D.

Multe steroide pot fi considerate ca derivaţi ai hidrocarburilor colestam şi coprostan(fig.2.3) în a căror structură intră nucleul steranic. Atomii de carbon şi poziţiile substituenţilor în molecula steroidelor se notează conform numerotaţiei date pentru colestan.



Fig.2.2. Scheletul structural al steroidelor.

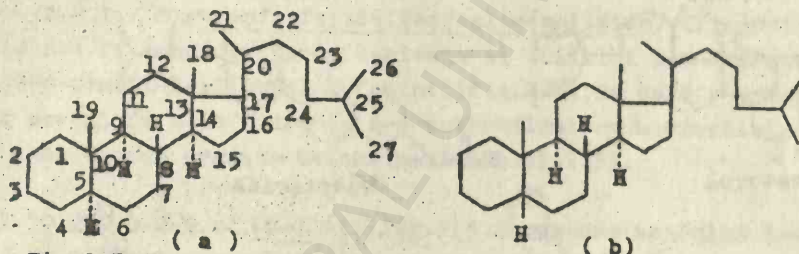


Fig.2.3. Structura colestanului(a) şi coprostanului(b).

O particularitate a celor mai multe steroide este prezenţa grupelor metil angular 19 şi 18 la C-10 şi C-13. Prin convenţie se admite că grupele metil 18 şi 19 se găsesc deasupra planului cuprinzînd cele 4 cicluri. Un substituent situat deasupra planului moleculei se află în poziţia β şi se leagă la atomul de carbon prin linie plină. Dacă substituentul este sub planul moleculei are o orientare α şi se notează cu linie punctată.

Atomul de hidrogen grefat la C-5 poate avea orientare <u>α</u> sau <u>β</u>. Cînd acest atom de hidrogen se găseşte de partea opusă grupei metil din C-10, inelele A şi B se condensează în trans, fiind practic în acelaşi plan. Steroidele cu conformaţia trans a inelelor A şi B aparţin seriei <u>allo</u> sau <u>C-5α</u>. Dacă atomul de hidrogen 5 se află de aceeaşi parte cu grupa metil din C-10, inelele A şi B sînt fuzionate în cis, aproape perpendicular unul pe celălalt. Izomerii cu conformaţia cis a inelelor A şi B formează seria <u>normală</u> sau

C-5β. Atomul de hidrogen are orientarea α în toţi hormonii steroidici în care atomul C-5 este saturat. Spre deosebire de ei, acizii biliari au atomul de hidrogen de la C-5 orientat β.

Un al doilea tip de stereoizomerie specifică steroidelor este determinat de prezenţa unei grupe -OH la C-3, grupă care, de asemenea, poate avea orientare α sau β.

2.3.2. Steroli. Steroidele, avînd o catenă laterală de 8-10 atomi de C în poziţia 17 şi o grupă hidroxil în poziţia 3, se cunosc sub numele de steroli. Ei sînt răspîndiţi atît în ţesuturile animale (zoosteroli) cît şi în plante (fitosteroli) şi ciuperci (micosteroli). In celula vie sterolii există liberi şi esterificaţi cu acizi graşi superiori.

Cel mai răspîndit şi mai important sterol din organismul animalelor superioare este colesterolul (fig.2.4). In sînge o treime

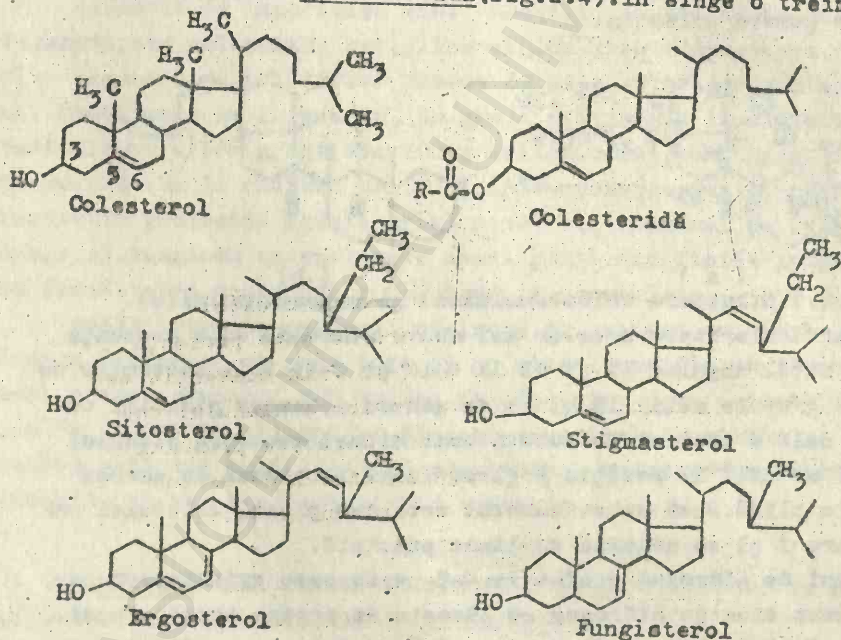


Fig.2.4. Structura chimică a unor steroli liberi şi a unei steride (colesteridă).

din cantitatea de colesterol se află sub formă de alcool liber, restul de 2/3 fiind esterificat mai ales cu acizi graşi nesaturaţi. Colesterolul participă, împreună cu lipidele complexe, la forma-

rea membranelor celulare şi a tecii de mielină din sistemul nervos, fiind implicat în reglarea fluidităţii acestor membrane la eucariote. In plus, colesterolul este precursorul altor steroli, a hormonilor steroidici şi acizilor biliari. In pielea mamiferelor se întîlneşte 7-dehidrocolesterolul care este provitamina D_3.

Dintre sterolii existenţi în plante se menţionează sitosterolul şi stigmasterolul (fig.2.4). In ciuperci şi drojdii au fost descoperiţi ergosterolul (provitamina D_2), fungisterolul (fig.2.4) etc.

2.4. LIPIDE COMPLEXE

După structura lor chimică lipidele complexe se împart în fosfolipide şi glicolipide.

2.4.1. FOSFOLIPIDE

Fosfolipidele, denumite şi fosfatide cuprind glicerofosfatidele şi sfingofosfatidele.

2.4.1.1. Glicerofosfatide (Fosfoglicerolipide). Glicerofosfatidele pot fi considerate ca derivaţi ai acidului L-α-fosfatidic (1,2-O-diacil-L-glicerol-3-fosfat) (fig.2.5), în care o grupă -OH din restul de acid fosforic s-a esterificat cu hidroxilul alcoolic al unui compus organic determinat (tabelul 2.3).

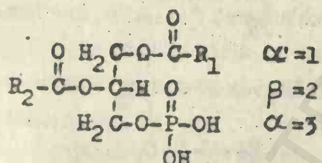
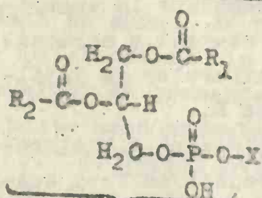
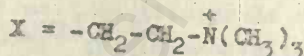
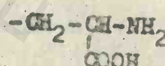
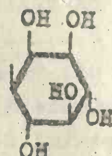
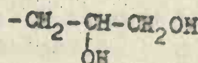
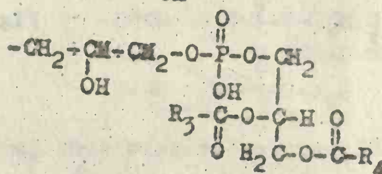
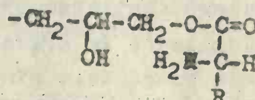


Fig.2.5. Structura acidului L-α-fosfatidic (Radicalul de la acest acid se numeşte fosfatidil).

Glicerofosfatidele sînt larg răspîndite în plante, animale şi microorganisme. Conţinînd grupe polare şi hidrofobe, glicerofosfatidele îndeplinesc în organismul viu un rol deosebit de important, întrucît ele constituie pînă la 50% din lipidele totale ale membranelor biologice, a căror funcţionare o condiţionează.

Intre glicerofosfatide cel mai adesea se întîlnesc fosfatidilcolinele (lecitinele), fosfatidiletanolaminele (fosfatidilcolaminele sau cefalinele), fosfatidilserinele şi fosfatidilinozitolii, conţinînd colină, etanolamină (colamină), serină şi respectiv inozitol. La majoritatea glicerofosfatidelor naturale acizii graşi saturaţi (C_{16}-C_{18}) se află obişnuit în poziţia 1, iar acizii graşi nesaturaţi (C_{16}-C_{20}), cu 1-4 duble legături, în poziţia 2, deşi se cunosc şi excepţii de la această regulă. Indepărtarea restului de

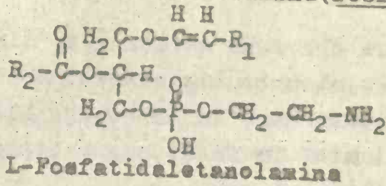
Tabelul 2.3. Structura chimică a principalelor glicerofosfatide

Glicerofosfatidă	Restul componentului alcoolic
 Rest fosfatidil	Formula structurală generală a glicerofosfatidelor
Fosfatidilcolina(lecitina)	
Fosfatidiletanolamina (fosfatidilcolamina sau cefalina)	
Fosfatidilserina	
Fosfatidilinozitol	
Fosfatidilglicerol	
Cardiolipina (difosfatidilglicerol)	
Fosfatidil-3'-O-aminoacil-glicerol	

de acid gras din poziţia 1 sau 2 a fosfatidilcolinelor conduce la formarea lizofosfatidilcolinelor(lizolecitinelor) care au o acţiune puternic hemolitică.

In ţesuturile animale, în special în muşchi şi sistemul nervos, au fost identificate glicerofosfatide, în care grupa -OH din poziţia 1 a glicerolului este eterificată cu un alcool α,β-nesaturat (forma enolică a aldehidei corespunzătoare: $R-CH_2-CH=O \rightleftharpoons R-CH=CH-OH$). Compuşii cu asemenea structură se numesc plasmalogene(acetalfosfolipide). Ele pot conţine colamină, colină sau serină. Formula plas-

malogenelor cu colamină(fosfatidaletanolamina) este dată în fig.2.6.



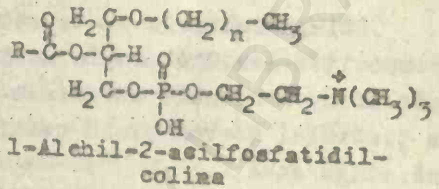


Fig.2.6.Structura unor plasmalogene.

In ţesuturile animale s-au descoperit,de asemenea,plasmalogene,fără baze azotate,asemănătoare triacilglicerolilor,conţinînd în poziţia 1 o legătură eterică,formată de un alcool α,β-nesaturat(1-alchenil-2,3-diacilglicerol).

O răspîndire largă în ţesuturile animale au derivaţii de 1-alchil-2-acilfosfatidilcolină(fig.2.6).

Proporţia plasmalogenelor este mai mare în ţesuturile animalelor tinere.Plasmalogenii şi lipidele conţinînd restul alchil(-OR) constituie corespunzător 10 şi 1% din cantitatea totală de lipide prezente în sistemul nervos central al omului.Conţinutul acestor lipide este deosebit de ridicat în organismul moluştelor,unde atinge 35% din cantitatea totală a fosfolipidelor.Deşi lipidele cu legătură eterică se consideră de obicei componenţi ai organismului animal,ele au fost descoperite de asemenea în plante.

Cardiolipina,prezentă în ţesuturile animale,cloroplaste şi cromatoforii bacteriilor,este singura fosfatidă cu proprietăţi imunologice.

2.4.1.2.Sfingofosfatide(sfingomieline).Prin hidroliza sfingofosfatidelor rezultă un aminoalcool dihidroxilic nesaturat,numit sfingozină(4-sfingenină),un acid gras superior,acid fosforic şi colină.In sfingomieline,acidul gras se uneşte cu grupa aminică a sfingozinei.Derivaţii N-acilaţi ai sfingozinei se numesc ceramide (fig.2.7).Sfingomielinele pot fi privite ca derivaţi fosfocolinici ai ceramidelor(fig.2.7).

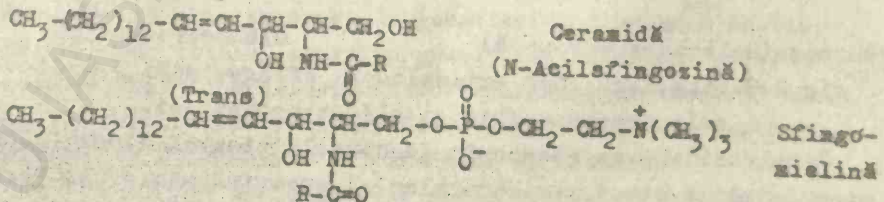


Fig.2.7.Structura ceramidei şi sfingomielinei.

Sfingomielinele se deosebesc între ele după acidul gras din compoziţia lor.Ele conţin acid palmitic,stearic,lignoceric,nervonic.Sfingomielinele se găsesc în cantitate mare în substanţa albă a ţesutului nervos şi în cantităţi mai mici în ficat,muşchi,splină,sînge etc.

2.4.2.GLICOLIPIDE

Glicolipidele,cum arată numele lor,sînt alcătuite din glucide şi lipide.Pot fi împărţite în glicosfingolipide şi glicozilgliceride.

2.4.2.1.Glicosfingolipide.Glicosfingolipidele sînt glicolipide care conţin sfingozină(4-sfingenină),dihidrosfingozină(sfinganină) şi fitosfingozină(4-hidroxisfinganina)(fig.2.8),sub formă de ceramide.In molecula glicosfingolipidelor,componenta glucidică se uneşte printr-o legătură β-glicozidică cu grupa alcoolică primară a ceramidei.

Intre glicosfingolipide se disting: cerebrozide,sulfatide,ceramidoligozaharide şi gangliozide.

Cerebrozidele,numite şi ceramidmonohexozide,au în molecula lor sfingozină,acid gras şi hexoză(galactoză sau glucoză).De aceea,adesea se numesc galactocerebrozide şi glucocerebrozide(fig. 2.8).

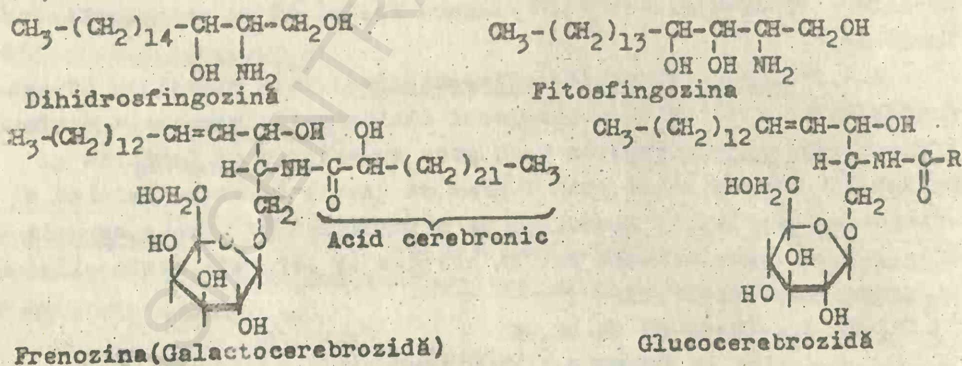


Fig.2.8.Structura unor aminoalcooli sfingozinici,a unei galactocerebrozide şi glucocerebrozidei.

Cerebrozidele se găsesc în ţesuturile(ţesutul nervos,plămîni,muşchi,splină etc.) vertebratelor şi nevertebratelor.Au fost identificate galactocercebrozide cu sfingozină şi dihidrosfingozină şi glucocerebrozide cu sfingozină şi fitosfingozină.

Cerebrozidele au fost descoperite şi în plante(Garter,1961; Sastry,Kates,1964).In cerebrozidele plantelor restul glicozilic este totdeauna D-glucoza,iar ca derivaţi ai sfinganinei se întîlnesc preponderent trans-8-dehidrofitosfingozina(fig.2.9) şi fitosfingozina.Ca acizi graşi în cerebrozidele vegetale s-au identificat acizii graşi saturaţi C_{16}, C_{22} sau C_{24}-2-hidroxiacizi.Structura unei cerebrozide vegetale se arată în fig.2.9.

$CH_3-(CH_2)_8-CH=CH-(CH_2)_3-CH(OH)-CH(OH)-CH(NH-CO-CH(OH)-R)-CH_2-O-$ (glucoză: HOH_2C, OH, HO, OH)

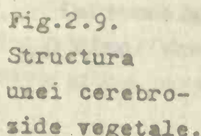


Fig.2.9. Structura unei cerebrozide vegetale.

Sulfatidele(cerebrozidsulfatidele) se deosebesc de cerebrozide prin prezenţa restului de acid sulfuric,legat esteric la atomul C-3 al galactozei.Ele posedă un caracter puternic acid.Acestor combinaţii li se atribuie un rol deosebit în transportul ionilor la nivelul membranelor biologice.Compoziţia sulfatidelor în acizi graşi este asemănătoare cu cea a cerebrozidelor.Sulfatidele se găsesc în creier şi alte ţesuturi.Nu se întîlnesc în celulele sanguine.

Ceramidoligozaharidele conţin heterooligozaharide unite printr-o legătură β-glicozidică cu ceramida.In tabelul 2.4 sînt incluse cîteva ceramidoligozaharide cu structură cunoscută.

Gangliozidele sînt cele mai complexe glicosfingolipide,a căror parte glucidică conţine glucoză,galactoză,N-acetilgalactozamină şi acid N-acetilneuraminic(NeuAc).Structura unor gangliozide se exemplifică în tabelul 2.4.

Gangliozidele au fost descoperite în ganglionii sistemului nervos,creier şi alte ţesuturi.In gangliozide predomină acidul stearic(80-90% din totalul acizilor graşi).Gangliozidele au un rol importamt în funcţionarea membranelor celulelor nervoase.In unele tulburări neuropsihice(boala Tay-Sachs,gargoilism etc.) apar în sistemul nervos gangliozide cu structură modificată.

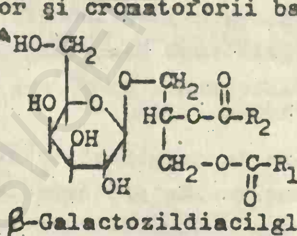
2.4.2.2.Glicozilgliceride.Din surse vegetale(cariopse de grîu şi porumb,alge roşii şi verzi,frunze de plante),de asemenea,din

Tabelul 2.4. Unele ceramidoligozaharide şi gangliozide

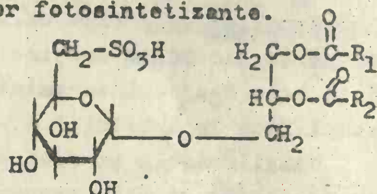
Denumirea	Structura
Lactozilceramida (citolipina H)	β-D-Gal(1→4)-β-D-Glc(1→1)-Ceramida
Galactozillactozil-ceramida	β-D-Gal(1→4)-β-D-Gal(1→4)-β-D-Glc(1→1)-ceramida
Ceramidtetrahexozida (Citolipina K sau globozida)	β-D-GalNAc(1→3)-β-D-Gal(1→4)-β-D-Gal(1→→4)-β-D-Glc(1→1)-ceramida
Gangliozid G_{M2}	β-D-GalNAc(1→4)-β-D-Gal(1→4)-β-D-Glc(1→1)-ceramidă; la Gal: (3 ↑α 2) NeuAc
Gangliozid G_{M1}	β-D-Gal(1→3)-β-D-GalNAc(1→4)-β-D-Gal(1→4)-β-D-Glc(1→1)-ceramida; la Gal: (3 ↑α 2) NeuAc
Gangliozid G_{D1a}	NeuAc(2→α3)-β-D-Gal(1→3)-β-D-GalNAc(1→4)-β-D-Gal(1→4)-β-D-Glc(1→1)-ceramida

ţesuturile animale (creier) şi unele microorganisme au fost izolate glicolipide numite glicozildiacilgliceroli şi sulfoglicozildiacilgliceroli, în care componentul glucidic poate fi D-galactoza, D-glucoza, D-manoza etc. Astfel, β-monogalactozildiacilglicerolul (fig, 2.10) a fost descoperit în plante şi în creier, iar 6-sulfo-6-deoxi-α-glucozildiacilglicerolul (fig. 2.10) a fost identificat în cloroplastele plantelor şi cromatoforii bacteriilor fotosintetizante.

Aici poate să se lege încă o moleculă de galactoză



β-Galactozildiacilglicerol



6-Sulfo-6-deoxi-α-glucozil-diacilglicerol (6-sulfochinovozildiacilglicerol)

Fig.2.10. Structura unor glicozilgliceride

In plante se întîlnesc şi diglicozildiacilgliceroli. Rolul biologic al glicozilgliceridelor încă nu este precizat.

3. AMINOACIZI SI PEPTIDE

3.1. AMINOACIZI

Aminoacizii(AA) sînt derivaţi ai acizilor carboxilici, la care unul sau doi atomi de hidrogen în radicalul hidrocarbonat au fost substituiţi cu grupa amino($-NH_2$).

In regnul animal şi vegetal se cunosc peste 150 de aminoacizi care există atît liberi cît şi în compoziţia substanţelor complexe. Aminoacizii identificaţi în proteine conţin grupele carboxil şi amino la acelaşi atom de carbon, care se numeşte C-α(tabelul 3.1). Aminoacizii care se află în stare liberă sau sînt componenţii diferitelor biomolecule, altele decît proteinele, pot avea grupa amino în poziţiile β, γ etc.

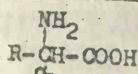
3.1.1. Structura chimică a principalilor aminoacizi din proteine. După structura lor chimică aminoacizii se clasifică în aminoacizi alifatici, aromatici şi heterociclici. Formulele structurale ale α-aminoacizilor, care intră în compoziţia proteinelor, se indică în tabelul 3.1.

Din tabelul 3.1 se observă că 7 aminoacizi conţin radicali R care la pH fiziologic pot purta sarcini negative sau pozitive. Grupele carboxilice β şi γ ale acizilor aspartic şi glutamic, de asemenea, grupa fenolică a tirozinei şi grupa -SH a cisteinei pot disocia, rezultînd formele anionice corespunzătoare. Grupa ε-NH_2 a lizinei, grupa guanidinică a argininei şi inelul imidazolic al histidinei se protonează cu formarea cationilor respectivi. Prolina diferă de ceilalţi aminoacizi din setul menţionat prin grupa amino secundară conţinută. De aceea, prolina uneori se numeşte iminoacid.

Aminoacizii aromatici(fenilalanina, tirozina şi triptofanul) conferă proteinelor proprietatea de a absorbi radiaţiile UV cu maximum între 275-285 nm. Pe această proprietate a proteinelor se bazează determinarea lor spectrofotometrică.

O particularitate caracteristică a cisteinei constă în capacitatea ei de a se oxida uşor prin pierderea atomului de H de la grupa -SH. Prin oxidarea a două molecule de cisteină rezultă aminoacidul numit cistină, care conţine o legătură disulfidică(fig.3.1). Legătura disulfidică se poate stabili între resturile de cisteină din acelaşi lanţ polipeptidic sau din două lanţuri adiacente. In proteine, de obicei, predomină cistina.

Tabelul 3.1. α-Aminoacizi prezenţi în compoziţia proteinelor

Denumirea uzuală şi sistematică	Prescurtarea denumirii	Structura	Caracterul radicalului R
1	2	3	4
α-Aminoacid			
1. Acizi monoaminomonocarboxilici			
Glicocol sau glicină (acid α-aminoacetic)	Gly, G	$H-CH(NH_2)-COOH$	nepolar
α-Alanina (acid α-aminopropionic)	Ala, A	$H_3C-CH(NH_2)-COOH$	nepolar
Valina (acid α-aminoizovalerianic)	Val, V	$H_3C-CH(CH_3)-CH(NH_2)-COOH$	nepolar
Leucina (acid α-aminoizocaproic)	Leu, L	$H_3C-CH(CH_3)-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	nepolar
Izoleucina (acid α-amino-β-metilvalerianic)	Ile, I	$H_3C-CH_2-CH(CH_3)-CH(NH_2)-COOH$	
Serina (acid α-amino-β-hidroxipropionic)	Ser, S	$HO-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	polar neionic
Treonina (acid α-amino-β-hidroxibutiric)	Thr, T	$H_3C-CH(OH)-CH(NH_2)-COOH$	polar neionic
Cisteina (acid α-amino-β-tiopropionic)	Cys, C	$HS-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	ionic
Metionina (acid γ-metiltio-α-aminobutiric)	Met, M	$H_3C-S-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	nepolar
2. Acizi monoaminodicarboxilici			
Acid aspartic (acid α-aminosuccinic)	Asp, D	$HOOC-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	ionic
Acid glutamic (acid α-aminoglutaric)	Glu, E	$HOOC-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	ionic
Asparagina (β-amida acidului aspartic)	Asn, N	$H_2N-C(=O)-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	polar neionic
Glutamina (γ-amida acidului glutamic)	Gln, Q	$H_2N-C(=O)-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	polar neionic

Tabelul 3.1(continuare)

1	2	3	4
3. Acizi diaminomonocarboxilici			
Lizina(acid α,ε-diaminocaproic)	Lys,K	$H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	ionic
Hidroxilizina*(A fost izolată din colagen)	Lys-OH	$H_2N-CH_2-CH(OH)-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	
Arginina(acid α-amino-δ-guanidinvalerianic)	Arg,R	$H_2N-C(=NH)-NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	ionic
4. Aminoacizi aromatici			
Fenilalanina(acid α-amino-β-fenilpropionic)	Phe,F	$C_6H_5-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	nepolar
Tirozina(acid α-amino-β-(p-hidroxifenil)-propionic)	Tyr,Y	$HO-C_6H_4-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	ionic
5. Aminoacizi heterociclici			
Prolina(acid pirolidin-α-carboxilic)	Pro,P	$H_2C-NH-CH(α)(COOH)-CH_2-CH_2$ (ciclu)	nepolar
Hidroxiprolina*(Este prezentă în colagen)	Pro-OH	$H_2C-NH-CH(COOH)-CH_2-HC(OH)$ (ciclu)	
Histidina(acid α-amino-β-imidazolilpropionic)	His,H	$HC{=}C(-CH_2-CH(NH_2)-COOH)-NH-CH{=}N$ (ciclu imidazolic)	ionic
Triptofan(acid α-amino-β-indolilpropionic)	Trp,W	indolil $-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	nepolar

*Cu excepţia hidroxilizinei şi hidroxiprolinei care sînt încorporate în lanţurile peptidice sub formă de lizină şi prolină,ulterior avînd loc hidroxilarea acestora,pentru toţi aminoacizii menţionaţi în tabelul 3.1 există ARN de transfer specifici.Incatenarea aminoacizilor în proteine este controlată genetic.

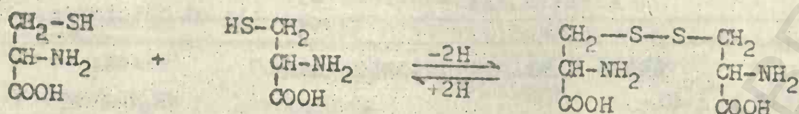
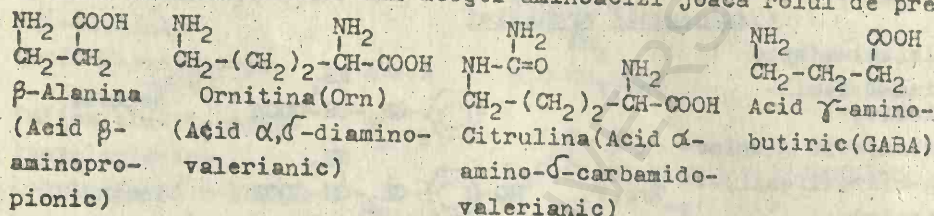


Fig.3.1.Conversia oxidativă a cisteinei în cistină.

3.1.2.<u>Aminoacizi naturali neproteinici</u>.Pe lîngă aminoacizii identificaţi în compoziţia proteinelor,există numeroşi alţi aminoacizi care,în stare liberă sau legată,se întîlnesc în diferite ţesuturi animale şi vegetale.In fig.3.2 se dau cîteva exemple de asemenea aminoacizi.Unii din aceşti aminoacizi joacă rolul de pre-



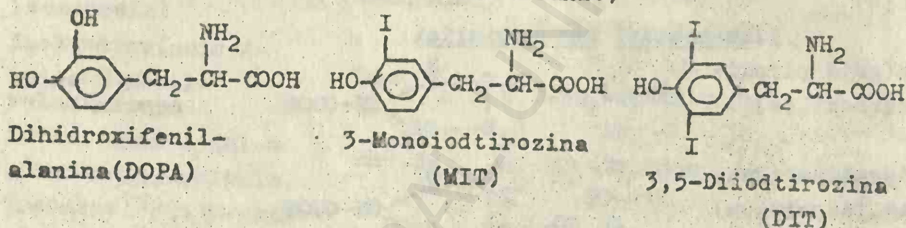


Fig.3.2.Exemple de aminoacizi care nu se întîlnesc în proteine.

cursori(β-alanina,MIT,DIT) sau intermediari(Orn,citrulina,homocisteina,homoserina) în procesele metabolice.Alţi aminoacizi(GABA) apar sub formă liberă,îndeplinind funcţii fiziologice precise.

Aminoacizii conţinuţi în bacterii,ciuperci şi plantele superioare se disting printr-o mare diversitate,unii avînd o structură particulară.Intre aminoacizii plantelor există reprezentanţi toxici(canavanina,acidul djencolic,β-cianalanina) pentru alte organisme.

3.1.3.<u>Stereochimia aminoacizilor</u>.Cu excepţia glicocolului, toţi aminoacizii naturali manifestă activitate optică,întrucît atomul de C-α din molecula lor este asimetric.In funcţie de dispunerea spaţială a grupei $-NH_2$ faţă de atomul de C-α,aminoacizii

posedă două configurații sterice.Toți aminoacizii care au aceeași configurație la atomul de carbon α ca și aldehida L-glicerică(vezi fig.1.2) se numesc L-aminoacizi(fig.3.3).Formele enantiomerfe ale L-aminoacizilor sînt D-aminoacizii(fig.3.3).Apartenența unui aminoacid la seria D sau L arată exclusiv configurația sterică a moleculei respective,nu însă și sensul rotației optice.Aminoacizii din seria sterică D și L pot fi dextrogiri(+) sau levogiri(-).Mai există și o formă optic inactivă, numită racemic care este un amestec echimolar de D- și L-stereoizomeri și se notează cu simbolul DL.

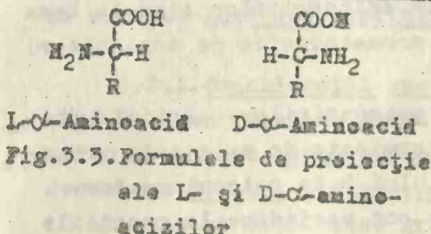


Fig.3.3.Formulele de proiecție ale L- și D-α-aminoacizilor

Insemnătatea biologică a L- și D-aminoacizilor este diferită. Toți aminoacizii care intră în constituția proteinelor sau se găsesc liberi în animale și plante aparțin seriei L.In natură,D-aminoacizii se descoperă numai în unele microorganisme(pereți celulari,antibiotice peptidice) și în tumorile maligne.Se poate considera că D-aminoacizii nu sînt asimilați de animale și om,întrucît sistemele enzimatice ale acestora prezintă o adaptare specifică pentru metabolizarea L-aminoacizilor.

3.1.4.Proprietățile acido-bazice ale aminoacizilor.Aminoacizii conținînd în molecula lor o grupă acidă(-COOH) și una bazică ($-NH_2$) manifestă caracter amfoter,adică pot funcționa ca acizi slabi sau baze slabe.Atît în soluție cît și în stare cristalizată, aminoacizii există predominant sub formă de ioni dipolari,numiți amfioni(zwitterioni).Stările de ionizare ale unui aminoacid în soluție apoasă variază cu pH(fig.3.4).Sub acțiunea curentului electric formele cationice și anionice ale aminoacizilor se vor depla-

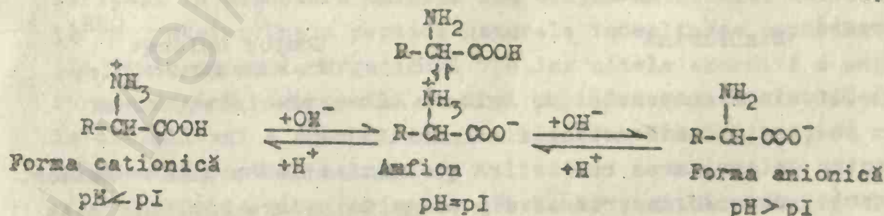


Fig.3.4.Dependența stării de ionizare a unui aminoacid de pH.

sa spre catod, respectiv anod. Pentru fiecare aminoacid există o valoare a pH-ului la care migrarea în cîmpul electric nu se produce. Acest pH la care numărul sarcinilor pozitive este egal cu cel al sarcinilor negative din molecula aminoacizilor se numeşte <u>punct izoelectric</u>(<u>pI</u>). Aceste proprietăţi ale aminoacizilor stau la baza separării lor prin electroforeză sau cromatografie pe schimbători de ioni.

3.1.5. <u>Proprietăţile chimice ale aminoacizilor</u>. Reacţiile chimice specifice aminoacizilor sînt determinate de existenţa grupelor -COOH şi $-NH_2$, precum şi a radicalului R în moleculele lor.

Grupele α-COOH ale aminoacizilor pot participa la reacţiile binecunoscute de esterificare, amidare, decarboxilare, reducere cu $LiBH_4$ etc.

Grupa α-NH_2 în aminoacizi se comportă ca şi grupa aminică în aminele primare, reacţionînd cu acidul azotos, aldehidele, clorurile şi anhidridele acide. Grupa α-NH_2 în aminoacizi prezintă şi unele reacţii caracteristice: reacţia cu clorocarbonatul de benzil ($C_6H_5-CH_2-O-\underset{\substack{\|\\O}}{C}-Cl$), reacţia cu cianatul ($CNO^-$) etc.

In unele reacţii ale aminoacizilor participă concomitent ambele grupe funcţionale carboxil şi amino. Din această serie foarte importante sînt reacţia cu ninhidrină şi reacţia de formare a <u>legăturilor peptidice</u>.

Prin încălzirea unui echivalent de aminoacid cu doi echivalenţi de ninhidrină se formează un produs puternic colorat în roşu-violet sau purpur-albastru (fig.3.5). Această reacţie se utilizează

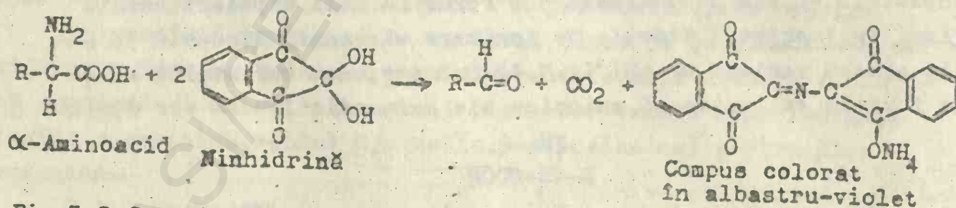


Fig.3.5. Structura compusului de culoare albastră-violet, format în reacţia aminoacidului cu ninhidrina.

larg pentru determinarea calitativă şi cantitativă a aminoacizilor.

Reacţia cea mai importantă din punct de vedere biologic este reacţia între grupa carboxil a unui aminoacid şi grupa amino a

altui aminoacid(fig.3.6).Legătura $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\underset{H}{\underset{|}{N}}-$ formată în această reacţie

$$H_2N-\underset{R_1}{\underset{|}{CH}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-OH + H-\underset{H}{\underset{|}{N}}-\overset{R_2}{\overset{|}{CH}}-COOH \xrightarrow[-H_2O]{} H_2N-\underset{R_1}{\underset{|}{CH}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\underset{H}{\underset{|}{N}}-\overset{R_2}{\overset{|}{CH}}-COOH$$

Fig.3.6.Principiul reacţiei de formare a unei legături peptidice.

se numeşte legătură peptidică.

3.2.PEPTIDE

3.2.1.Consideraţii generale asupra peptidelor.Compuşii rezultaţi în urma reacţiei între grupele α-COOH şi α-NH_2 ale aminoacizilor se numesc peptide.După numărul resturilor de aminoacizi se deosebesc di-,tri-,tetra-,penta-peptide etc.Peptidele conţinînd 2-10 aminoacizi alcătuiesc grupa oligopeptidelor,iar cele cu un număr mai mare de resturi de aminoacizi - grupa polipeptidelor.In formulele structurale ale peptidelor,obişnuit aminoacidul cu grupa α-NH_2 liberă(aminoacidul N-terminal) se scrie la stînga(capătul N-terminal),iar aminoacidul cu grupa α-COOH liberă(aminoacidul C-terminal) la dreapta(capătul C-terminal(fig.4.1).Insă uneori cele două grupe se leagă una cu alta,rezultînd o peptidă ciclică.

In peptide resturile de aminoacizi se numerotează în ordinea succesiunii lor,începînd cu aminoacidul N-terminal.Peptidele se denumesc în concordanţă cu aminoacizii constituenţi,adăugîndu-se sufixul il la numele fiecărui aminoacid cu excepţia aminoacidului C-terminal,pentru care se menţine numele neschimbat.De exemplu, glutationul(tabelul 3.2) are denumirea γ-L-glutamil-L-cisteinil-glicocol.In mod curent,peptidele sînt desemnate prin denumiri uzuale.

Se cunosc peptide naturale,prezente în organismele vii şi peptide obţinute prin sinteze chimice,în laborator.

3.2.2.Peptide naturale.Animalele,plantele şi microorganismele sintetizează diferite peptide,ce prezintă o serie de particularităţi în structura chimică sau conţin aminoacizi neidentificaţi în proteine.Unele peptide naturale îndeplinesc importante funcţii fiziologice în organismul viu,iar altele exercită o acţiune farmacologică remarcabilă.Numărul peptidelor naturale descoperite în ultimii ani a crescut considerabil.Tabelul 3.2 conţine cîteva exemple de peptide naturale.

Carnozina şi anserina se găsesc în ţesutul muscular al verte-

Tabelul 3.2. Citeva peptide naturale

Denumirea uzuală şi sistematică	Structura chimică	Indicarea prescurtată a structurii
Carnozina(β-Alanil--L-histidina)	$H_2N-CH_2-CH_2-C(=O)-N(H)-CH(COOH)-CH_2-$(imidazol, HN, N)	H_2N-β-Ala.His--COOH
Anserina(β-Alanil-N-metil-L-histidina)	$H_2N-CH_2-CH_2-C(=O)-N(H)-CH(COOH)-CH_2-$(imidazol, H_3C-N, N)	
Glutationul(γ-L-Glutamil-L-cisteinil-glicocol)	$H_2N-C(H)(COOH)-CH_2-CH_2-C(=O)-N(H)-C(H)(CH_2-SH)-C(=O)-N(H)-CH_2-COOH$	H_2N-Glu.Cys.Gly-COOH
Gramicidina S	L-Val←L-Orn←L-Leu←D-Phe←L-Pro ↓ ↑ L-Pro→D-Phe→L-Leu→L-Orn→L-Val	

oratelor. Conţinutul acestor dipeptide depinde de natura muşchiului şi specia animală. Rolul fiziologic al carnozinei şi anserinei nu este elucidat. Ele funcţionează ca sisteme tampon, stabilizează activitatea unor enzime, influenţează diferite procese biochimice din ţesutul muscular (glicoliza, fosforilarea oxidativă etc.).

Glutationul (G.SH) este o tripeptidă răspîndită în majoritatea celulelor animale şi vegetale. Enzima glutation-reductaza (EC 1.6.4.2) catalizează oxidarea glutationului (forma tiolică) în forma disulfidică, cunoscută ca glutation oxidat: G.SH + G.SH ⇌ G.S-S.G + 2H. Ambele forme ale glutationului participă la transferul hidrogenului în diferite sisteme de oxidoreducere. Funcţia biochimică cea mai importantă a glutationului constă în protejarea contra oxidării a grupelor -SH din moleculele enzimelor tiolice.

Un mare interes prezintă, evident, peptidele cu activitate antimicrobiană: gramicidina S, polimixinele (circulinele), bacitracinele etc. care conţin diferiţi D-aminoacizi. In organismul animal se întîlnesc multe peptide cu activitate hormonală.

4. PROTEINE

Proteinele şi acizii nucleici sînt cei mai importanţi componenţi chimici ai materiei vii. Oriunde există viaţă pe pămînt, ea este indisolubil legată de proteine şi acizi nucleici.

Proteinele îndeplinesc multe funcţii importante în organismul viu. Proteinele, împreună cu lipidele şi glucidele, reprezintă suportul chimic structural al tuturor formaţiunilor morfologice evidenţiate în celulele şi organele animalelor şi plantelor şi în microorganisme. In acest caz, proteinele au funcţie structurală (rol plastic). Numeroase proteine joacă rolul de catalizatori ai reacţiilor chimice în sistemele biologice. Aceste proteine se numesc enzime. Funcţie catalitică sau enzimatică în organismul viu posedă numai proteinele. Diferite proteine intră în compoziţia muşchilor şi participă la fenomenul de contracţie musculară, asigurînd toate formele de mişcare mecanică, inclusiv activitatea plămînilor, inimii, peristaltismul tractului gastro-intestinal, deplasarea vieţuitoarelor în spaţiu etc. Datorită proteinelor cu funcţii transportoare în organism se realizează transportul unor substanţe micromoleculare şi al ionilor anorganici.

Sub formă de anticorpi, proteinele apără organismul împotriva substanţelor străine şi celulelor provenite din alte organisme. Această reacţie de apărare a organismului viu poartă numele de imunitate. Unele proteine sau polipeptide pot acţiona ca hormoni, participînd la reglarea proceselor biochimice.

Diferenţierea, creşterea, dezvoltarea, reproducerea şi alte însuşiri ale viului depind de proteine specifice.

Prin urmare, proteinele şi derivaţii lor joacă un rol central în toate procesele şi fenomenele vieţii. Datele biochimiei contemporane constituie o confirmare strălucită a ideilor materialismului dialectic în domeniul cunoaşterii naturii.

Diversitatea funcţiilor îndeplinite de proteine reflectă structura chimică deosebit de complexă şi înaltul grad de specializare ale acestor biopolimeri.

4.1. STRUCTURA PROTEINELOR

Proteinele sînt polimeri, mai exact copolimeri liniari, în structura cărora intră ca unităţi monomere α-aminoacizii. In moleculele

proteinelor resturile de aminoacizi se unesc covalent unul cu altul prin intermediul legăturilor peptidice(amidice),formînd lanţuri(catene) polipeptidice neramificate.Un lanţ polipeptidic constă dintr-o „coloană vertebrală" în care se repetă periodic legătura peptidică şi o parte variabilă datorată radicalilor laterali distinctivi ai aminoacizilor constituenţi(fig.4.1).

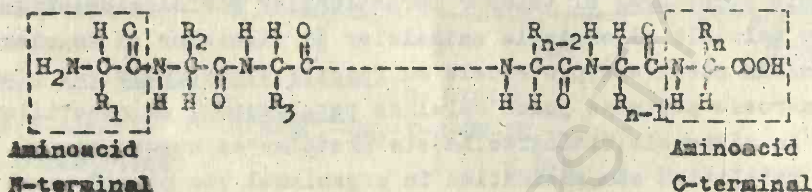


Fig.4.1.Formula structurală a unei polipeptide.

Macromoleculele proteinelor pot fi alcătuite din unul sau cîteva lanţuri polipeptidice identice sau diferite.De exemplu,ribonucleaza conţine un singur lanţ polipeptidic,iar molecula hemoglobinei este constituită din 4 lanţuri polipeptidice care pot fi de două tipuri.Lanţurile polipeptidice ale proteinelor oligomere sînt unite unul cu altul prin legături intercatenare covalente şi necovalente.O legătură covalentă intercatenară tipică este legătura disulfidică care se formează prin oxidarea resturilor de cisteină din două lanţuri adiacente(fig.3.1).In setul legăturilor intercatenare necovalente se includ: a)punţile de hidrogen între funcţiile >C=O şi >NH ale legăturilor peptidice sau între grupele hidrofile ale resturilor de aminoacizi;b)legăturile ionice între -COOH liberi ai acizilor monoaminodicarboxilici şi grupele $-NH_2$ libere din molecula acizilor diaminomonocarboxilici;c)legături nepolare(hidrofobe) prin forţe van der Waals între resturile hidrocarbonate ale aminoacizilor etc.

4.1.1.Compoziţia proteinelor în aminoacizi.Compoziţia aminoacidică a unei proteine precizează numărul şi proporţia diferiţilor aminoacizi în macromolecula proteinică.

Pentru stabilirea compoziţiei în aminoacizi a proteinelor,acestea se supun hidrolizei acide,alcaline sau enzimatice.In amestecul de aminoacizi obţinut prin hidroliza proteinei se determină cantitativ fiecare aminoacid,utilizînd cromatografia pe schimbători de ioni,gaz-cromatografia etc.

Determinarea aminoacizilor din molecula proteinică a arătat că diverse proteine se deosebesc radical după conţinutul lor în aminoacizi. Intr-o serie de proteine unii aminoacizi(ca metionina şi triptofanul) pot lipsi sau se găsesc în cantităţi neglijabile, iar alţi aminoacizi(alanina şi leucina) în cantităţi foarte mari. Cunoaşterea compoziţiei în aminoacizi a moleculelor proteinice este foarte importantă pentru aprecierea reactivităţii chimice şi stabilirea valorii biologice(nutritive) a proteinelor.

4.1.2. Structura primară a proteinelor. Cercetările biochimice moderne au relevat că proteinele se deosebesc între ele atît prin compoziţie cît şi succesiunea aminoacizilor.

Succesiunea sau secvenţa de unire a aminoacizilor prin legături peptidice în molecula proteinică reprezintă structura primară a proteinelor, denumită adesea şi structură covalentă. Secvenţa resturilor de aminoacizi în molecula proteinelor este determinată genetic.

Cu ajutorul difracţiei de raze X s-a descoperit că lungimea legăturii C-N în peptide este mult mai mică decît în alte combinaţii. Datele experimentale indică că legătura peptidică -CO-NH- constituie un sistem simplu conjugat, în care conjugarea se realizează între perechea de electroni π ai grupei >C=O şi perechea de electroni neparticipanţi ai atomului de N vecin. Repartizarea celor 4 electroni mobili în legătura peptidică poate fi imaginată prin două stări de rezonanţă I şi II, care pot fi redate global prin formula III(fig.4.2). In urma delocalizării electronilor, legătura peptidică

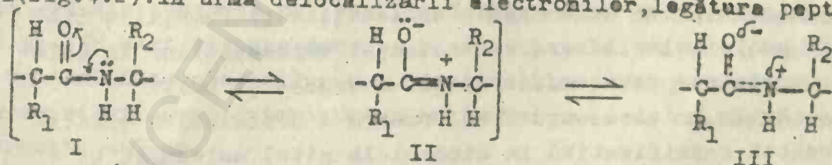


Fig.4.2. Caracterul parţial de dublă legătură a grupei peptidice.

manifestă un caracter pronunţat de legătură dublă. Fenomenul de conjugare determină, pe de o parte, coplanaritatea legăturii peptidice, adică atomii care formează scheletul ei se găsesc în acelaşi plan. Pe de altă parte, datorită caracterului parţial de legătură dublă, este posibilă o izomerie cis-trans a legăturii peptidice. In proteine predomină configuraţia trans(fig.4.3), întrucît aceasta este mai

puţin îngreunată steric decît forma cis,care se formează cel mai adesea la atomul de N al prolinei.

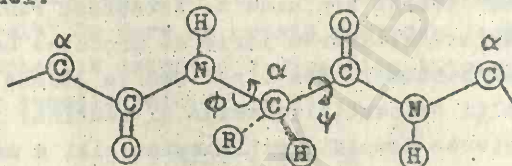


Fig.4.3.Configuraţia trans a legăturii peptidice şi unghiurile de rotaţie în jurul legăturilor C_{α}-N şi C_{α}-C într-un lanţ peptidic.

Pe baza celor menţionate se poate considera că lanţul polipeptidic este format din unităţi peptidice plane,unite între ele prin legături C_{α}-N şi C_{α}-C,în jurul cărora este posibilă rotirea radicalilor laterali R ai aminoacizilor constituenţi.Rotirea în jurul acestor legături se desemnează prin unghiurile ϕ şi ψ (fig. 4.3) Elucidarea structurii primare a proteinelor constituie o sarcină extrem de complexă,care reclamă tehnici deosebit de laborioase şi de mare fineţe.Această direcţie actuală de cercetare biochimică prezintă o importanţă teoretică şi practică excepţională.Datele experimentale arată că structura primară a proteinelor condiţionează diversitatea şi specificitatea acestora.Fiecare specie de animale şi plante posedă proteinele sale proprii,specifice.La acelaşi organism apar diferenţe între proteinele organelor,iar în celulă găsim deosebiri chiar între proteinele organitelor.Specificitatea proteinelor şi capacitatea organismelor vii de a sintetiza în succesiunea de generaţii aceleaşi proteine specifice explică diferenţierea speciilor de plante şi animale.Apoi, secvenţa aminoacizilor determină proprietăţile şi funcţiile biologice ale proteinelor.Alterarea secvenţei aminoacizilor în moleculele de proteine poate cauza funcţii anormale şi boli.

Cercetările privind structura primară a proteinelor constituie o treaptă semnificativă în studiul la nivel molecular al procesului de evoluţie a speciilor.

4.1.3.<u>Conformaţia</u> <u>proteinelor</u>.Proteinele în stare nativă posedă o orientare spaţială tridimensională caracteristică care se numeşte <u>conformaţie</u>.Noţiunea de conformaţie implică,pe lîngă structura primară,<u>niveluri de organizare</u> de ordin mai superior: structura secundară,structura terţiară şi structura cuaternară.

Structura secundară a proteinelor. Posibilitatea de rotaţie a radicalilor de aminoacizi în jurul axelor de legătură C_α–C şi C_α–N din lanţul polipeptidic favorizează apariţia unei structuri spaţiale specifice a macromoleculelor proteinice, cunoscută sub numele de structura secundară a proteinelor. Structura secundară a proteinelor este stabilizată de punţi de hidrogen care se formează intracatenar sau intercatenar între grupele carbonilice şi iminice ale legăturilor peptidice.

Cea mai răspîndită variantă a structurii secundare a lanţurilor polipeptidice este α-helixul, propus de L. Pauling şi R. Corey (1951) şi confirmat prin analiza cu raze X a unor proteine obţinute în stare cristalină.

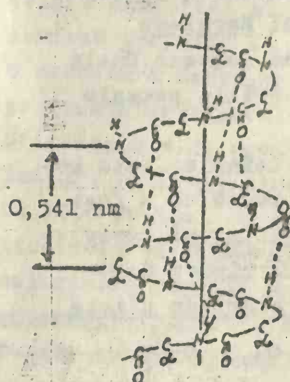


Fig.4.4. Modelul general al α-helixului.

Ne putem imagina că α-helixul ia naştere prin înfăşurarea elicoidală (spiralată) a lanţului polipeptidic pe suprafaţa unui cilindru ipotetic (fig.4.4). Fiecare tură (spiră) a α-helixului este alcătuită din 3,6 resturi de aminoacizi. Distanţa între ture de-a lungul axei α-helixului este egală cu 0,541 nm. Diametrul α-helixului este de 0,101 nm.

Structura în α-helix este stabilizată prin punţi de hidrogen intracatenare între grupele >C=O şi >NH ale legăturilor peptidice. Fiecare grupă >C=O formează o legătură de hidrogen cu cea de a patra grupă >NH din secvenţa polipeptidică. Legăturile de hidrogen între >C=O şi >NH sînt dispuse aproape perfect paralel cu axa α-helixului. Radicalii aminoacizilor componenţi ai lanţului polipeptidic sînt orientaţi spre exteriorul α-helixului, ceea ce condiţionează interacţiunea lor.

In funcţie de direcţia de spiralare a lanţului polipeptidic, teoretic poate să existe un α-helix de dreapta şi un α-helix de stînga. I proteinele naturale formate din L-aminoacizi predomină α-helixul de dreapta care este mai stabil energetic.

Studiile de electronomicroscopie au arătat că moleculele unor proteine au un diametru ce depăşeşte valoarea caracteristică pentru α-helix. Aceasta se datoreşte faptului că proteinele respective

sînt alcătuite din mai multe α-helixuri care se răsucesc unul în jurul celorlalte,la fel ca firele dintr-un cablu.De exemplu,α-keratina din păr,lînă şi piele poate să conţină 3-7 α-helixuri,orientate în aceeaşi direcţie şi stabilizate prin legături -S-S- între resturile de cisteină dispuse în lanţurile polipeptidice vecine.

In general,proteinele native nu conţin o structură elicoidală totală,aceasta depinzînd de natura şi succesiunea aminoacizilor din lanţul polipeptidic.Astfel,prezenţa prolinei,hidroxiprolinei şi glicocolului în anumite zone ale lanţului polipeptidic determină întreruperea structurii elicoidale şi apariţia unor regiuni neorganizate,torsionate întîmplător.

O ipoteză interesantă asupra structurii secundare a proteinelor a fost emisă încă în 1935-1936 de profesorul Haralamb Vasiliu,ctitorul chimiei agricole în Universitatea ieşeană.Unele din trăsăturile acestei ipoteze se regăsesc în teoriile actuale referitoare la structura proteinelor.

O altă variantă a structurii secundare a proteinelor este modelul „straturilor pliate" sau β-structura(β din cauză că a fost elucidată după α-helix),propusă,de asemenea,de Paulimg şi Corey, în acelaşi an.In proteine au fost descoperite două tipuri de β-structură(fig.4.5).Unul din ele,numit modelul straturilor pliate

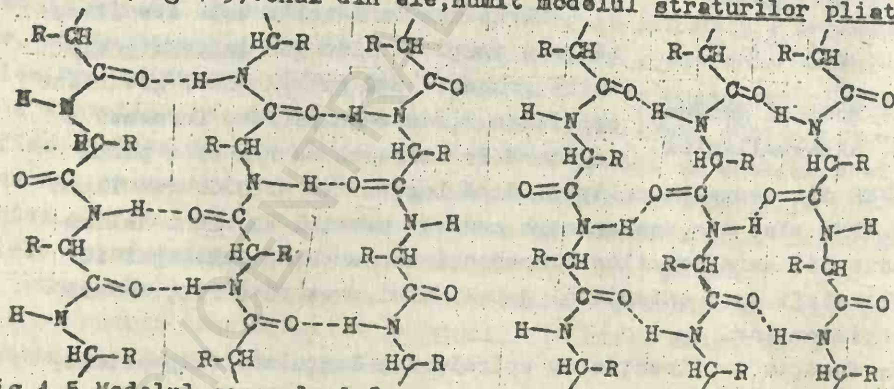


Fig.4.5.Modelul general al β-structurii.La stînga - modelul straturilor pliate antiparalele,caracteristic pentru fibroina din mătase;la dreapta - modelul straturilor pliate paralele,specific β-keratinei din păr,unghii,pene.

antiparalele,este format din lanţuri polipeptidice întinse în for-

mă de zig-zag,ale căror grupe NH_2-terminală şi COOH-terminal sînt orientate în direcţii opuse.Al doilea model al β-structurii,modelul straturilor pliate paralele este alcătuit din lanţuri polipeptidice cu aceeaşi orientare.Ambele tipuri de β-structură sînt stabilizate prin punţi de hidrogen intercatenare între grupele >C=O şi >NH ale legăturilor peptidice din lanţurile polipeptidice adiacente.Unii aminoacizi(acidul glutamic,prolina,asparagina,histidina, serina şi lizina) destabilizează structura straturilor pliate.

In organismul animalelor se găseşte o cantitate mare de colagen(circa 1/3 din totalul proteinelor) care este componentul proteinic principal al oaselor,cartilagiilor,tendoanelor,pielii etc. Această proteină se caracterizează printr-o rigiditate extremă şi o structură unică,condiţionată de cantitatea mare de glicocol(33%), prolină+hidroxiprolină(21%) şi alanină(11%).Unitatea structurală principală a colagenului este tropocolagenul,care constă din trei lanţuri polipeptidice cu aceeaşi dimensiune,fiecare conţinînd cîte 1000 resturi de aminoacizi.Cele trei lanţuri polipeptidice elicoidale se răsucesc fiecare în jurul celorlalte formînd un triplu helix sau superhelix(fig.4.6).Ansamblul astfel format este menţinut prin legături de hidrogen întercatenare orientate perpendicular pe axa longitudinală a moleculei de tropocolagen.

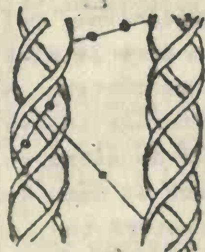


Fig.4.6.Modelul structurii superelicoidale a tropocolagenului.

Structura terţiară a proteinelor.
Prin structura terţiară a proteinelor se înţelege replierea şi înfăşurarea segmentelor elicoidale şi neelicoidale ale lanţului polipeptidic într-o organizare spaţială complexă sub formă de ghem sau globulă.Structura terţiară a proteinelor se constituie într-un sistem stabil datorită interacţiunilor hidrofobe între radicalii laterali ai aminoacizilor,legăturilor de hidrogen,legăturilor ionice şi legăturilor disulfidice.In acest mod,formarea structurii globulare native specifice pentru o proteină dată este un proces cooperant,bazat pe diferite tipuri de interacţiuni,predominant necovalente.

Printre primele proteine a căror structură terţiară a fost descifrată se află <u>mioglobina</u>. Această proteină se găseşte în muşchii scheletici unde are rol în transportul şi depozitarea O_2. Ea este deosebit de abundentă la mamiferele acvatice (balenă, focă şi morsă). Molecula mioglobinei, constituită dintr-un lanţ polipeptidic şi hem, prezintă structura terţiară redată în fig. 4.7.

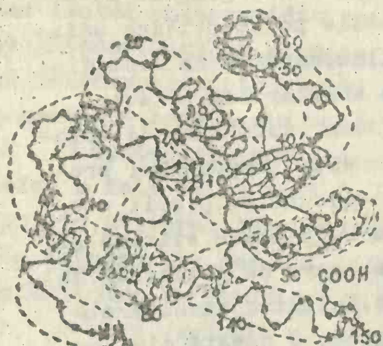


Fig. 4.7. Structura terţiară a mioglobinei. Cu cifre se indică fiecare al zecelea aminoacid. Discul reprezintă molecula de hem.

Structura terţiară a proteinelor determină activitatea şi funcţiile lor în organismul viu.

4.1.3.3. <u>Structura cuaternară a proteinelor</u>. Structura cuaternară reprezintă nivelul de organizare cel mai înalt al proteinelor şi este rezultatul asocierii a două sau mai multe lanţuri polipeptidice cu structură terţiară într-un ansamblu sau agregat complex şi compact. Proteinele formate din mai multe lanţuri (catene) polipeptidice se numesc proteine <u>oligomere</u>, iar catenele care le alcătuiesc <u>protomeri</u> sau <u>monomeri</u>.

Structura cuaternară a proteinelor poate fi stabilizată îndeosebi de legăturile ionice cu interacţiune electrostatică puternică şi legăturile de hidrogen.

In natură se cunosc multe proteine oligomere. Ca exemplu de proteină cu structură terţiară şi cuaternară precizată poate servi hemoglobina (Hb). Molecula Hb este alcătuită din patru monomeri, respectiv din patru catene polipeptidice, fiecare fiind cuplată cu restul de hem (fig. 12.20).

Structura cuaternară a proteinelor se află la baza activităţii lor biologice. De exemplu, asocierea <u>miozinei</u> şi <u>actinei</u> conduce la formarea <u>actomiozinei</u> care este proteina contractilă a fibrei musculare. Apoi, structura cuaternară determină funcţiile catalitice ale enzimelor construite din mai multe lanţuri polipeptidice.

In încheiere, să reţinem că toate cele patru tipuri de structură ale moleculei proteinice determină proprietăţile fizice, chimice şi biologice ale proteinelor, de asemenea, interacţiunea dintre aces-

tea şi ceilalţi compuşi chimici din celulă. Structurile proteinelor condiţionează aproape toate însuşirile biologice ale materiei vii, indiferent de treapta de organizare şi locul organismului viu în scara evolutivă.

4.2. Forma moleculelor de proteine.

Proteinele se deosebesc atît după structura internă cît şi după forma moleculelor lor. Pe baza diferenţelor în structura tridimensională proteinele pot fi împărţite în proteine fibrilare şi proteine globulare.

Proteinele fibrilare au aspect filiform, sînt insolubile în apă şi îndeplinesc în organism rol de susţinere şi rezistenţă mecanică a diferitelor ţesuturi. Ca exemple de proteine fibrilare se menţionează: keratinele, fibroina, colagenul etc.

Proteinele globulare au formă elipsoidală sau aproape sferică. Toate proteinele globulare sînt solubile în apă şi în soluţii saline diluate. In celulă proteinele globulare îndeplinesc diferite funcţii ca funcţia enzimatică, hormonală etc.

Există proteine care au o morfologie a moleculelor intermediară între forma globulară şi cea fibrilară. Aparţin acestor proteine miozina din muşchi şi fibrinogenul din sînge.

4.3. Proprietăţile proteinelor.

4.3.1. Masa moleculară a proteinelor. Proteinele sînt substanţe macromoleculare cu masa moleculară de la cîteva mii pînă la sute de mii şi chiar milioane de daltoni. In tabelul 4.1 sînt redate masele moleculare ale unor proteine tipice.

Tabelul 4.1. Masele moleculare ale unor proteine.

Proteină	Masa moleculară	Proteină	Masa moleculară
Insulină (bovină)	5.700	Albumină serică (om)	68.500
Citocrom c (inimă de bovine)	13.370	Hexokinază (drojdie)	102.000
Mioglobină (inimă de cal)	16.900	Catalază (ficat de cal)	221.600
Chimotripsinogen (bovin)	23.200	Fibrinogen (uman)	339.700
β-Lactoglobulină (bovină)	35.000	Urează (fasole Jack)	482.700
Hemoglobină (umană)	64.500	Miozină (cod)	524.800

Pentru determinarea masei moleculare a proteinelor se utili-

zează ultracentrifugarea,gel-filtrarea,electroforeza în gel de poliacrilamidă şi alte metode.

4.3.2.Caracterul coloidal al proteinelor.Prin dizolvarea proteinelor în apă se obţin soluţii coloidale.Aceasta înseamnă că macromoleculele proteinice dispersate în soluţie au dimensiunile unor particule care nu dializează prin membrane sem permiabile.Proteinele aparţin coloizilor hidrofili,deci au o mare afinitate pentru apă.Apa legată coloidal cu proteinele nu îngheaţă la scăderea temperaturii pînă la -100°C.Aceasta explică în parte capacitatea unor organisme de a suporta temperaturi foarte coborîte.

4.3.3.Solubilitatea proteinelor.Fiecare proteină posedă o solubilitate determinată.Unele proteine se dizolvă uşor în apă şi soluţii saline,altele numai în soluţii de săruri,iar proteinele grupei a treia se dizolvă în amestecul de apă şi alcool.Solubilitatea proteinelor în apă depinde de existenţa grupelor polare hidrofile(-COOH,-NH_2,-OH,>C=O,>N-H) la suprafaţa moleculelor proteinice.Aceste grupe se solvatează datorită fixării moleculelor de apă prin legături de hidrogen,ceea ce conduce la hidratarea macromoleculelor proteinice.Solubilitatea proteinelor depinde considerabil de pH mediului.De obicei,solubilitatea minimă la punctul izoelectric este condiţionată de atracţiile electrostatice între moleculele proteinice vecine care au sarcina electrică netă nulă.

Prezenţa sărurilor în soluţie poate mări sau poate micşora solubilitatea proteinelor.La concentraţii mici de săruri,solubilitatea multor proteine creşte odată cu forţa ionică a soluţiei.In concentraţii mari sărurile neutre micşorează solubilitatea proteinelor şi determină precipitarea lor din soluţii apoase.Acest fenomen numit salifiere se datoreşte concurenţei dintre moleculele sării şi macromoleculele proteinice pentru moleculele de apă.Precipitarea proteinelor,deci scăderea hidratării lor se poate efectua şi prin adăugarea de solvenţi organici(alcool,acetonă) la soluţiile proteinice apoase.

4.3.4.Denaturarea proteinelor.Prin denaturarea proteinelor se înţelege modificarea parţială sau totală a conformaţiei lor,fără însă ca structura primară să fie afectată.Denaturarea proteinelor poate fi provocată de factori fizici(căldură,radiaţii,agitare) sau de diferiţi reactivi,ca de exemplu acizii şi bazele tari,solvenţii

organici,ureea,detergenţii etc.Acţiunea agenţilor denaturanţi se exercită asupra legăturilor ce menţin structura secundară,terţiară şi cuaternară a moleculelor de proteine.Denaturarea conduce la schimbarea proprietăţilor fizice şi reactivităţii moleculelor proteinice.De cele mai multe ori prin denaturare,proteinele pierd activitatea lor biologică.

Diversele proteine se comportă diferenţiat în raport cu agenţii denaturanţi.Adesea,denaturarea proteinelor este reversibilă.

4.3.5.<u>Proteinele ca electroliţi amfoteri</u>.Proteinele,întrucît conţin grupe $-NH_2$ şi -COOH libere,aparţinînd aminoacizilor constituenţi,pot avea comportare de acid sau bază,în funcţie de partenerul cu care reacţionează.De aceea proteinele se numesc <u>electroliţi amfoteri</u> sau <u>amfoliţi</u>.

Capacitatea proteinelor de a disocia ca acizi(în mediul bazic) şi ca baze(în mediul acid) condiţionează într-un grad însemnat proprietăţile fizico-chimice şi funcţiile biologice ale acestor biopolimeri.De exemplu,s-a stabilit că viscozitatea,presiunea osmotică,hidratarea şi îmbibarea proteinelor depind de gradul lor de disociere.Caracterul amfoter al proteinelor se află la baza funcţiei lor de sisteme tampon,care asigură menţinerea constantă a pH lichidelor biologice în organismul animal şi vegetal.

Starea de ionizare a proteinelor determină migrarea lor în cîmpul electric.Macromoleculele proteinice încărcate pozitiv(cationii) sau negativ(anionii) vor migra spre catod şi respectiv spre anod.Pe această proprietate se bazează separarea şi determinarea cantitativă a proteinelor cu ajutorul electroforezei.La un pH specific pentru fiecare proteină,moleculele ei sînt electric neutre şi nu se deplasează sub acţiunea curentului electric.Acest pH se numeşte <u>punct izoelectric</u>(<u>pI</u>).Valorile pI ale unor proteine sînt redate în tabelul 4.2.Punctul izoelectric al proteinelor depinde

<u>Tabelul 4.2</u>.Punctele izoelectrice ale unor proteine.

Proteina	pI	Proteina	pI
Pepsina	1	Mioglobina	7
α-Cazeina	4,1	Ribonucleaza	7,8
Catalaza	5,6	Chimotripsina	8,1
Hemoglobina	6,7	Citocrom c	9,8-10,1

de numărul şi natura grupelor încărcate electric existente în moleculele lor.Molecula proteinică se încarcă pozitiv dacă pH mediului este mai mic decît pI şi negativ la un pH>pI.Electroneutralitatea moleculelor proteinice la pI crează condiţiile pentru distrugerea învelişului lor de hidratare şi împreună cu pierderea sarcinii electrice favorizează coagularea proteinelor.Prin aceasta se înţelege apropierea şi aglutinarea particulelor proteinice,creşterea dimensiunilor acestora şi precipitarea lor.

Ca amfoliţi,proteinele leagă atît cationii cît şi anionii.Fixarea specifică de către proteine a unor ioni mici,de exemplu Ca^{2+}, joacă un rol important în procesele fiziologice.Unele substanţe organice(acizii tricloracetic,picric) şi anorganice(acid fosfowolframic,ionii Pb^{2+},Hg^{2+},Ba^{2+}) precipită cu uşurinţă proteinele din soluţie.Multe proteine native sînt metaloproteine,în care partea proteinică prin intermediul grupelor ionizate complexează specific cu ionii Cu^{2+},Zn^{2+},Fe^{2+},Fe^{3+}.

4.4.Clasificarea proteinelor.

După compoziţie şi structura chimică proteinele se clasifică în holoproteine şi heteroproteine.Holoproteinele(proteinele simple) sînt constituite numai din aminoacizi.Heteroproteinele,denumite încă proteine complexe(conjugate) conţin pe lîngă componenta proteinică şi alte combinaţii chimice de natură neproteinică,numite grupări prostetice.

4.4.1.Holoproteine.In clasa holoproteinelor intră albuminele, globulinele,glutelinele,prolaminele, protaminele ,histonele şi scleroproteinele(tabelul 4.3).

Albuminele,globulinele şi alte proteine simple pot conţine o componentă glucidică sau lipidică.

4.4.2.Heteroproteine(Proteine conjugate sau complexe).Din clasa heteroproteinelor fac parte acele proteine în compoziţia cărora, pe lîngă componenta proteinică,există şi o substanţă de natură neproteinică.Această subtanţă neproteinică,denumită grupare prostetică poate avea o structură chimică foarte diversă şi se fixează de componenta proteinică prin legături covalente sau prin interacţiuni ionice,hidrofobe.

In funcţie de natura grupării prostetice se deosebesc următoarele tipuri de heteroproteine: metaloproteine,fosfoproteine,glicoproteine,lipoproteine,cromoproteine şi nucleoproteine(tabelul 4.4).

Tabelul 4.3. Grupele principale de holoproteine.

Denumirea grupei	Proprietăţi	Răspîndire şi reprezentanţi
Albumine	-solubile în apă şi soluţii saline diluate; au caracter acid şi precipită în soluţii saturate de sulfat de amoniu; M = 35.000 - 70.000.	în ţesuturile animalelor şi plantelor; leguminа din seminţele de leguminoase, serumalbumina, lactalbumina, ovoalbumina.
Globuline	-greu solubile sau insolubile în apă; se dizolvă în soluţii diluate de săruri neutre (NaCl, KCl), de baze şi acizi; sînt precipitate la o concentraţie de 50% a sulfatului de amoniu; M = 90.000 - 1.500.000.	în plante (edestina în cînepă, fazeolina în fasole, glicinina în soia etc.) şi animale (serumglobuline, fibrinogenul din plasma sanguină, lactoglobulinele etc.).
Gluteline	-insolubile în apă, în soluţii saline şi în alcool etilic; solubile în soluţii diluate (0,2-2%) de hidroxizi alcalini.	în seminţele cerealelor şi citoplasma frunzelor verzi (glutenina din grîu, orizenina din orez, glutelina din porumb ş.a.).
Prolamine	-insolubile în apă; se dizolvă în alcool etilic 60-80%; bogate în acid glutamic şi prolină, sărace în lizină şi triptofan; prolaminele împreună cu glutelinele formează glutenul, care conferă aluatului consistenţa caracteristică.	în seminţele de graminee (gliadina din grîu şi secară, hordeina din orz, zeina din porumb etc.)
Protamine	-solubile în apă; se disting printr-un conţinut ridicat (80%) de Arg, Lys şi His; M ~ 10.000.	în nucleul celulelor animale (clupeina din scrumbii, salmina din somn etc.).
Histone	-conţin 20-30% Lys, Arg şi His; histonele, ca şi protaminele sînt implicate în reglarea biosintezei acizilor nucleici şi proteinelor.	în compoziţia cromatinei din nucleul celulelor animale şi vegetale.

Tabelul 4.3(continuare).

Scleroproteine	
-insolubile în apă, soluţii slab acide sau slab alcaline, în soluţii saline şi solvenţi organici; în general, nu sînt atacate de enzimele proteolitice; au structură fibrilară.	în regnul animal (colagenul - ţesut conjunctiv; α- şi β-keratine - epidermă, păr, pene, formaţiuni cornoase; elastina - fibrele elastice din ţesutul conjunctiv; fibroina - mătasea naturală).

Tabelul 4.4. Grupele principale de heteroproteine.

Denumirea grupei / Gruparea prostetică şi reprezentanţi	Răspîndire şi funcţia
Metaloproteine	
-gruparea prostetică este un metal (Fe, Cu, Mn, Zn, Co, Mg etc.); exemple:	
1) [illegible]tina conţine 20% fier trivalent	ficat/depozit de Fe
2) transferina (siderofilina) este un complex fieroproteinic;	plasma sanguină; transportor de fier.
3) ceruloplasmina este o glicoproteină ce conţine 0,34% Cu;	sînge; transportor de Cu.
4) metaloenzime	organismele animale şi vegetale.
Fosfoproteine	
-au drept grupare prostetică H_3PO_4 care se leagă de componenta proteinică printr-o legătură esterică cu -OH serinei, mai rar al treoninei; au caracter acid, formînd săruri cu Ca sau K; exemple:	
1) α-, β- şi γ-cazeinele	lapte; valoare nutritivă mare.
2) vitelina, vitelenina şi fosfovitina	gălbenuşul de ou; furnizor de P şi AA.

Tabelul 4.4(continuare)

Glicoproteine	
-conţin ca grupare prostetică diferite glucide(pentoze,hexoze,hexozamine,acizi uronici,acizi sialici);exemple:	în organismele animale şi vegetale;
1)glicoproteinele sanguine	determină specificitatea grupelor sanguine;
2)γ-globuline	anticorpi;
3)ovomucoidul şi avidina	albuşul de ou;
4)o serie de glicoproteine îndeplinesc funcţie enzimatică sau hormonală.	
Lipoproteine	
- gruparea prostetică este de natură lipidică(fosfolipide,acilgliceroli, colesterol liber şi esterificat); α- şi β-lipoproteinele din plasma sanguină participă la transportul unor substanţe.	constituenţi ai membranelor biologice,sistemului nervos şi plasmei sanguine.
Cromoproteine	
-gruparea prostetică este o substanţă colorată de natură porfirinică sau neporfirinică;	în organismele animale şi vegetale;
exemple de cromoproteine protoporfirinice:	
1)mioglobina din muşchi - transportor şi rezervor de oxigen;	
2)hemoglobinele - transportor de oxigen;	
3)oxidoreductaze(citocromi,catalază,peroxidaze);	
4)cloroplastina din cloroplastele celulei vegetale - participă în fotosinteză;	
exemple de cromoproteine neporfirinice : flavinenzime etc.	
Nucleoproteine	
-gruparea prostetică o constituie acizii nucleici;	
exemple: 1)ribonucleoproteine	în citoplasma celulei, ribozomi şi nucleul celular;
2)deoxiribonucleoproteine	în cromozomi,mitocondrii,cloroplaste.

5. ACIZI NUCLEICI

Acizii nucleici(AN) constituie gruparea prostetică a nucleoproteinelor care sînt proteine complexe, răspîndite în toate organismele vii, unde au mare însemnătate în multe procese celulare.

Se cunosc două clase de AN: acizii deoxiribonucleici (ADN) şi acizii ribonucleici (ARN). Atît ADN cît şi ARN sînt substanţe macromoleculare, polimere. Moleculele AN se formează prin repetarea multiplă a cîtorva monomeri principali, numiţi mononucleotide sau simplu nucleotide. Deci, AN reprezintă polinucleotide.

5.1. Componenţii AN

Un nucleotid se compune dintr-o bază azotată, o monozaharidă (pentoză) şi acid fosforic: bază azotată-pentoză-acid fosforic.

5.1.1. Baze azotate pirimidinice şi purinice. In calitate de baze azotate, în marea majoritate a nucleotidelor din compoziţia AN, se întîlnesc cinci compuşi heterociclici, cu răspîndire universală, derivaţi de la pirimidină şi purină (fig. 5.1). Bazele pirimi-

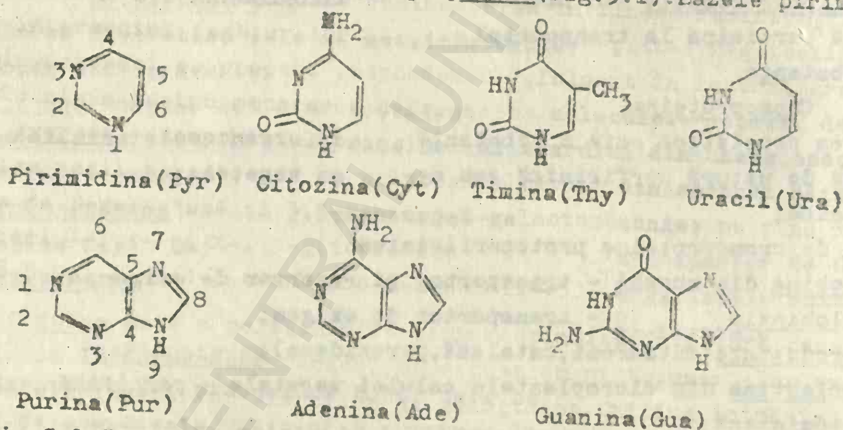


Fig. 5.1. Formulele structurale ale bazelor pirimidinice şi purinice principale din compoziţia AN.

dinice sînt citozina (2-oxi-4-aminopirimidina), timina (5-metil-2,4-dioxipirimidina) şi uracilul (2,4-dioxipirimidina). In ADN se descoperă ca baze pirimidinice principale citozina şi timina, iar în ARN - citozina şi uracilul. Bazele purinice sînt adenina (6-aminopurina) şi guanina (2-amino-6-oxipurina). Acestea se găsesc ca baze purinice principale atît în ADN cît şi în ARN.

Bazele pirimidinice şi purinice au capacitatea de a participa la fenomenul de tautomerie, care constă în schimbarea poziţiei unui atom de hidrogen şi deplasarea legăturii duble vecine, realizîndu-se un tautomerism de tip <u>lactim</u>-<u>lactam</u>: H-O-C=N ⇌ O=C—N-H . In AN naturali predomină formele lactamice ale bazelor pirimidinice şi purinice care sînt mai stabile la pH neutru şi acid. Apariţia formelor tautomere lactimice ale bazelor azotate în moleculele AN are urmări genetice deosebite.

Alături de bazele azotate principale, în AN naturali pot să intre, într-o cantitate mică, unii derivaţi ai bazelor pirimidinice şi purinice, cum ar fi derivaţii metilaţi etc.

5.1.2. <u>Pentoze</u>. Componentul glucidic al ADN este D-2-deoxiriboza în forma β-furanozică. ARN conţine în calitate de pentoză β-D-ribofuranoza (fig.5.2)

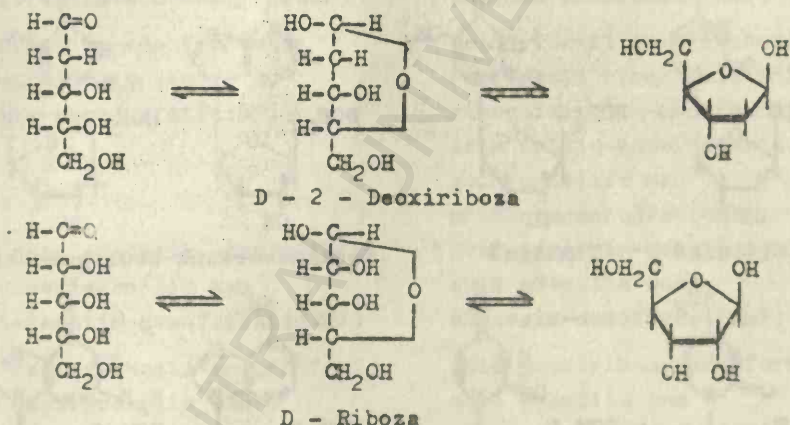


Fig.5.2. Formulele deschise (aldehidice), ciclice (semiacetalice) şi de perspectivă ale D-2-deoxiribozei şi D-ribozei.

5.1.3. <u>Nucleozide</u>. Combinaţia bazei azotate cu pentoza se numeşte <u>nucleozid</u>. Unirea celor doi componenţi ai nucleozidelor naturale se realizează printr-o legătură β-glicozidică între atomul de carbon C-1' al pentozei* şi atomul de azot N-1 al bazei pirimidinice sau N-9 al bazei purinice. In funcţie de natura pentozei, nucleozidele se grupează în <u>deoxiribonucleozide</u> (<u>deoxinucleozide</u>) şi <u>ribonucleozide</u>. Denumirea deoxinucleozidelor şi ribonucleozidelor se core-

*Atomii de C din restul de pentoză se numerotează de la 1' la 5' pentru a nu fi confundaţi cu atomii de C din nucleul pirimidinic sau purinic.

lează cu numele bazei azotate(tabelul 5.1 şi fig.5.3).

Tabelul 5.1.Denumirea celor mai răspîndite nucleozide

Baza azotată	Deoxinucleozide	Ribonucleozide
Citozina	Deoxiribocitidina sau deoxicitidina(dCyd)	Citidina(Cyd)
Timina	Timidina(dThd)	Riboziltimidina(Thd)
Uracil	-	Uridina(Urd)
Adenina	Deoxiriboadenozina sau deoxiadenozina(dAdo)	Adenozina(Ado)
Guanina	Deoxiriboguanozina sau deoxiguanozina(dGua)	Guanozina(Gua)

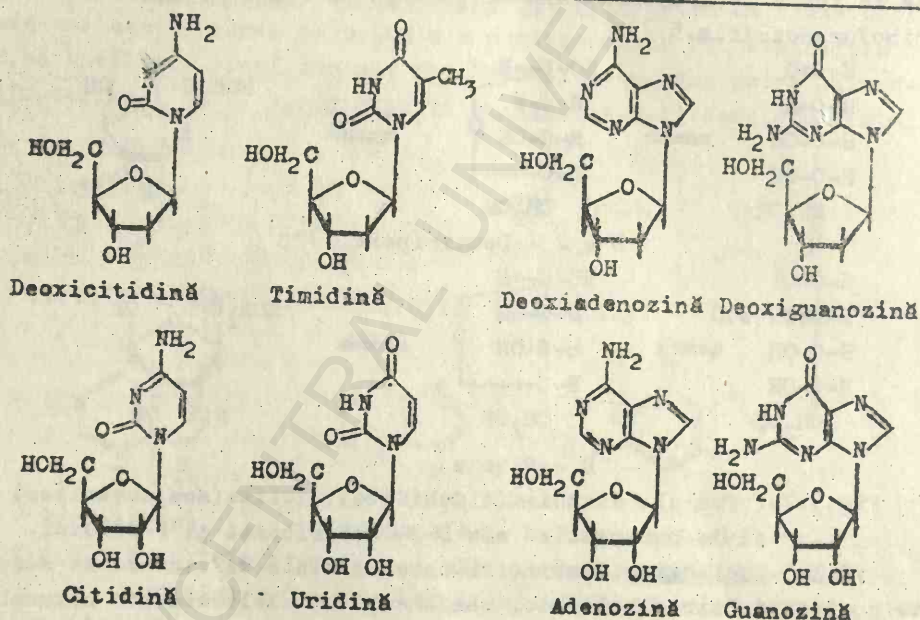


Fig.5.3.Structura principalelor deoxiribonucleozide din ADN şi a principalelor ribonucleozide din ARN.

Pe lîngă nucleozidele principale(tabelul 5.1) există numeroase alte nucleozide naturale şi sintetice.Multe dintre ele manifestă proprietăţi antibiotice.Astfel sînt nucleozidele în care β-D-riboza este substituită cu β-D-arabinoza.

5.1.4. Nucleotide. Prin fosforilarea unuia din hidroxilii alcoolici liberi ai restului de pentoză din molecula nucleozidelor rezultă nucleozid-monofosfaţii sau nucleotidele. Plecînd de la tipul pentozei pe care o conţin, nucleotidele se împart în deoxiribonucleotide şi ribonucleotide. La rîndul lor, deoxiribonucleotidele şi ribonucleotidele se subdivid în funcţie de baza azotată din structura lor (tabelul 5.2).

Tabelul 5.2. Denumirea şi notarea simbolică a nucleotidelor principale care intră în compoziţia AN.

Deoxiribonucleotide	Ribonucleotide
Acid deoxicitidin-monofosforic, acid deoxicitidilic sau deoxicitidin-monofosfat (dCMP)	Acid citidin-monofosforic, acid citidilic sau citidin-monofosfat (CMP)
Acid timidin-monofosforic, acid timidilic sau timidin-monofosfat (dTMP)	Acid riboziltimidin-monofosforic, acid riboziltimidilic sau riboziltimidin-monofosfat (TMP)
---	Acid uridin-monofosforic, acid uridilic sau uridin-monofosfat (UMP)
Acid deoxiadenozin-monofosforic, acid deoxiadenilic sau deoxiadenozin-monofosfat (dAMP)	Acid adenozin-monofosforic, acid adenilic sau adenozin-monofosfat (AMP)
Acid deoxiguanozin-monofosforic, acid deoxiguanilic sau deoxiguanozin-monofosfat (dGMP)	Acid guanozin-monofosforic, acid guanilic sau guanozin-monofosfat (GMP)

Nucleotidele se mai pot deosebi între ele şi prin poziţia restului de acid fosforic existent în moleculele lor. In cazul deoxiribonucleozidelor, acidul fosforic poate esterifica -OH ataşat la C-3' şi C-5' din radicalul de deoxiriboză. In ribonucleozide este posibilă fixarea acidului fosforic la atomii de carbon C-2', C-3' şi C-5' ai ribozei. Nucleotidele derivate prin fosforilarea -OH 5', 3' sau 2' din nucleozidele corespunzătoare se numesc nucleozid-5'-monofosfaţi sau 5'-nucleotide, nucleozid-3'-monofosfaţi sau 3'-nucleotide şi nucleozid-2'-monofosfaţi sau 2'-nucleotide. Dintre aceşti izomeri posibili, 3'- şi 5'-nucleotidele constituie unită-

tile monomere ale AN. In fig.5.4 se concretizează structura unor 3'-nucleotide şi 5'-nucleotide.

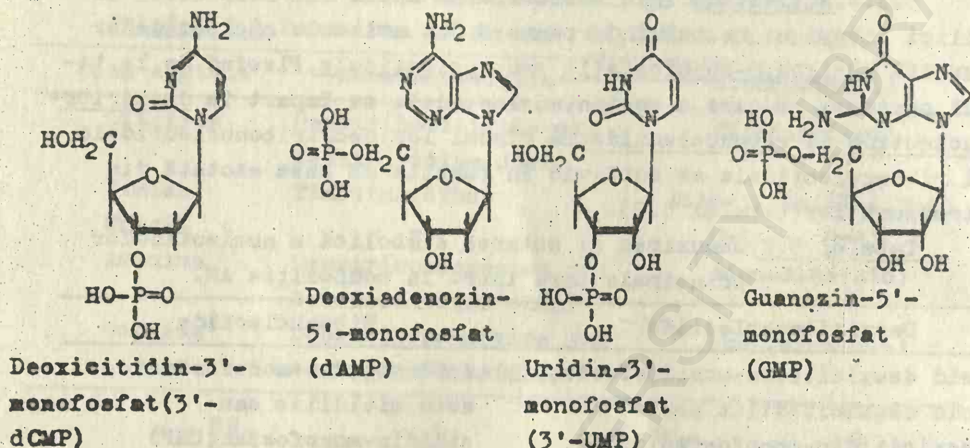


Fig.5.4. Exemple de 3'-nucleotide şi 5'-nucleotide (în cazul acestora nu se mai indică poziţia restului de fosfat în notarea simbolică).

Nucleotidele nu sînt numai unităţile monomere ale AN; ele îndeplinesc şi alte funcţii importante în organismele vii. Toate celulele vii conţin nucleotide avînd 2 şi 3 resturi de acid fosforic legate la C-5' al pentozei. In aceşti derivaţi, numiţi nucleozid-difosfaţi(NDP) şi respectiv nucleozid-trifosfaţi(NTP), radicalii de acid fosforic se unesc prin legături chimice de tip special, denumite legături macroergice sau bogate în energie (eliberează prin hidroliză 7.000-9.000 kcal/legătură), care se redau prin simbolul ~. Aparţin NDP şi NTP acidul adenozin-difosforic sau adenozindifosfatul(ADP), acidul adenozin-trifosforic sau adenozintrifosfatul(ATP) (fig.5.5), de asemenea, difosfaţii şi trifosfaţii celorlalte nucleozide. ADP, ATP, precum şi NDP şi NTP altor baze azotate pirimidinice şi purinice joacă un rol deosebit în metabolismul intermediar al substanţelor şi transformările energetice celulare.

In celula vie se formează şi diesteri ciclici ai nucleozidelor pe calea unirii hidroxililor 3' şi 5' cu ajutorul acidului fosforic. Unul din aceşti diesteri ciclici este adenozin-3',5'-ciclofosfatul (3',5'-AMP sau AMPc), cu rol de „mesager secundar"(vezi „Hormoni"). Funcţii importante deţin nucleotidele sub formă de coenzime(vezi „Enzime").

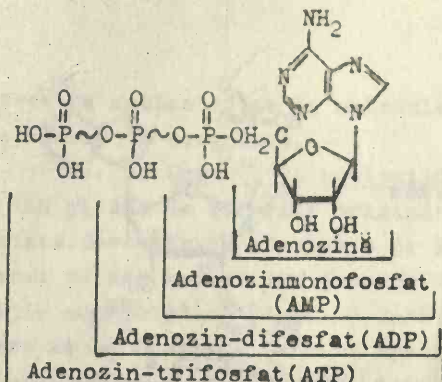


Fig.5.5.Structura adenozin-oligofosfaţilor

5.2.Structura AN

5.2.1.Structura primară a AN.AN reprezintă polinucleotide în care mononucleotidele succesive se leagă unul cu altul prin legături fosfodiesterice între atomii de carbon C-3' şi C-5' din resturile de pentoză.Deci,AN sînt constituiţi din catene polinucleotidice liniare în care punţile 3',5'-fosfodiesterice alternează succesiv cu resturile de pentoză la care se află grefate,ca radicali laterali,bazele pirimidinice şi purinice(fig.5.6).

Succesiunea diferitelor nucleotide în catena polinucleotidică defineşte structura primară a AN.Secvenţa şi proporţia celor patru nucleotide principale în moleculele ADN,respectiv ARN,sînt caracteristice pentru fiecare specie de animale şi plante.Structura primară a AN are o mare importanţă,deoarece asigură codificarea biochimică a informaţiei genetice în macromoleculele de ADN şi ARN.

In ADN eucariot s-au decelat trei tipuri de secvenţe deoxiribonucleotidice: secvenţe înalt repetitive,secvenţe moderat repetitive şi secvenţe unice de deoxiribonucleotide.Secvenţele înalt repetitive din ADN sînt deosebit de bogate în perechea dA:::dT sau dG:::dC şi se găsesc de obicei în centromerii cromozomilor.Printre secvenţele moderat repetitive din ADN eucariot se înscriu genele ce codifică ARN ribozomal(ARNr),ARN de transfer(ARNt) ca şi histonele.La multe eucariote unele secvenţe moderat rep titive alternează cu porţiuni spaţiatoare,numite spaceri.Aproximativ 70% din ADN majorităţii eucariotelor constă din secvenţe unice de deoxiribonucleotide.Aceste secvenţe aflate într-o singură copie per genom corespund genelor structurale,care controlează structura primară a tuturor ARN mesageri(ARNm).Secvenţele unice din ADN eucariot se interpun cu succesiuni moderat repetitive avînd o lungime de 300 perechi de deoxiribonucleotide.Proporţia celor trei tipuri de

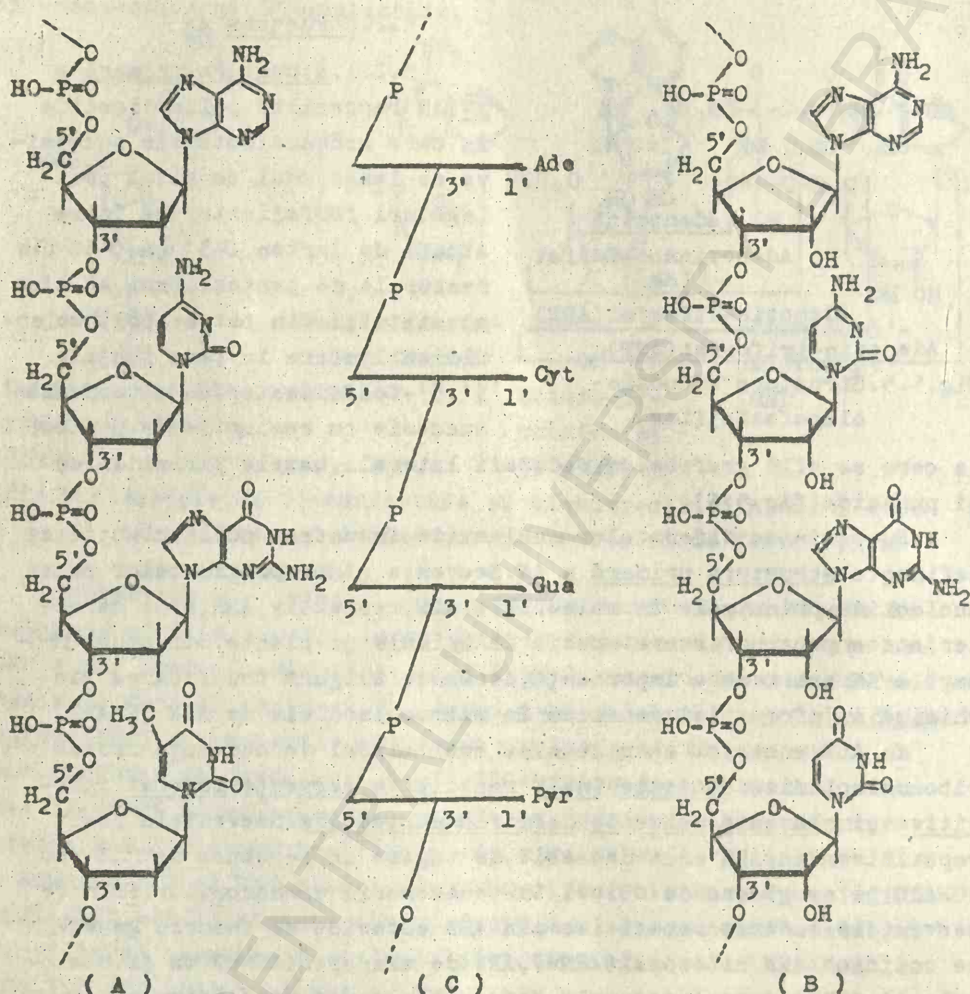


Fig.5.6. Structura unui segment din lanţul polideoxiribonucleotidic al ADN(A) şi din catena poliribonucleotidică a ARN(B). La mijloc este redată formula simplificată a unui polinucleotid(C) care poate fi scrisă încă mai restrîns: pApCpGpPyr. Cu literele A, C,G,Pyr se simbolizează nucleotidele corespunzătoare, iar litera p desemnează restul de fosfat. Cînd litera p se găseşte la stînga este esterificat -OH de la carbonul C-5', iar cînd se află la dreapta - hidroxilul de la C-3'.

secvenţe nucleotidice în moleculele ADN nu este aceeaşi la diferite specii de eucariote.

5.2.1.1. Compoziţia nucleotidică a AN. Compoziţia nucleotidică a ADN şi ARN de diferite origini se distinge printr-o mare diversitate. Cercetările efectuate de E.Chargaff în anii 1949-50 au relevat că ADN izolat din ţesuturile aceluiaşi organism are o compoziţie nucleotidică identică. Insă compoziţia nucleotidică a ADN diferă de la o specie la altă specie de organisme, constituind o caracteristică a organismului dat, a speciei respective. Altfel vorbind, ADN posedă specificitate de specie. Totuşi compoziţia nucleotidică a ADN are unele particularităţi determinate, generalizate de Chargaff în următoarele reguli: 1) cantitatea adeninei este egală cu cantitatea timinei (A*=T* sau A/T=1); 2) raportul între cantitatea de guanină şi cantitatea de citozină este egal cu 1 (G=C sau G/C=1); 3) suma molară procentuală a bazelor purinice este egală cu suma molară procentuală a bazelor pirimidinice (A+G=C+T sau A+G/C+T=1); 4) după cum A+C=G+T sau A+C/G+T=1. Practic, de la o specie la alta se modifică numai raportul A+T/G+C. Acest raport, numit coeficient de specificitate, reflectă toate diferenţele posibile în compoziţia nucleotidică a ADN şi prezintă o importanţă mare în taxonomie (A.N. Belozerski şi A.S.Spirin, 1962). In funcţie de dominarea primei sau celei de a doua perechi de baze azotate, se disting ADN de tip AT şi de tip GC. Pentru majoritatea animalelor raportul A+T/G+C=1,3-1,5, iar la plantele superioare oscilează între 1,1 şi 1,7.

Pe lîngă bazele azotate principale, ADN unor bacterii conţine o serie de baze metilate, ca 5-metilcitozina şi 6-metiladenina. Metilcitozina, de asemenea, este prezentă în ADN unor plante superioare şi animale. In ADN bacteriofagilor seriei T par citozina a fost înlocuită cu hidroximetilcitozină.

Deosebirile esenţiale între moleculele de ADN sînt determinate de structura lor primară. Chiar în cazul unei compoziţii nucleotidice identice succesiunea deoxiribonucleotidelor poate fi deosebită pentru ADN diferitelor organisme vii. Faptul că deoxiribonucleotidele se pot succeda practic într-o infinitate de variante în catenele polideoxiribonucleotidice, condiţionează variabilitatea

*Simbolurile A(dA), G(dG), C(dC) şi T(dT) desemnează deoxiribonucleotidele corespunzătoare adeninei, guaninei, citozinei şi timinei.

extraordinară a ADN la diversele specii de vieţuitoare şi explică marea diversitate a faunei şi florei.

Compoziţia nucleotidică a ARN de la diferite organisme se modifică în limite mai restrînse, comparativ cu compoziţia nucleotidică a ADN. In cazul A[illegible] raporturile între nucleotide respectă regula lui Chargaff: G+U [illegible] C, excepţie făcînd ARN virali. Pentru caracterizarea compoziţiei nucleotidice a ARN se poate utiliza coeficientul de specificitate, adică raportul G+C/A+U, după cum şi raportul A+G/C+U. Principial pot exista ARN de tipul GC(G+C/A+U >1) şi de tipul AU(G+C/A+U<1), ARN în care predomină bazele purinice(A+G/C+U >1) sau bazele pirimidinice(A+G/C+U<1). De obicei, ARN din majoritatea organismelor aparţin tipului GC. Diferenţe pregnante în compoziţia nucleotidică a ARN se pot observa numai la speciile îndepărtate din punct de vedere sistematic. Insă analogia şi chiar identitatea compoziţiei nucleotidice a ARN la speciile apropiate nu exclud posibilitatea specificităţii lui. Aceasta este determinată de succesiunea nucleotidelor(structura primară) în moleculele ARN.

5.2.2. Structura secundară a AN. In anul 1953, J.D.Watson şi F. C.H.Crick, plecînd de la regulile lui Chargaff privind compoziţia nucleotidică şi bazîndu-se pe caracteristicele roentgenostructurale ale AN, obţinute de M.H.F.Wilkins, A.R.Stokes şi H.R.Wilson (1953) şi R.E.Franklin şi R.G.Gosling(1953), au ajuns la o formulare genială a structurii secundare a ADN, recunoscută azi ca fiind cea mai plauzibilă dintre ipotezele existente. Această descoperire, distinsă cu premiul Nobel în anul 1962, a dat răspuns la multe întrebări, a ridicat o serie de noi probleme şi a condus la dezvoltarea rapidă a unor domenii din biochimie şi genetică.

Conform modelului imaginat de cei doi autori, macromolecula ADN este alcătuită din două lanţuri polideoxiribonucleotidice, răsucite sub formă de spirală dublă spre dreapta, în jurul unei axe de simetrie comună. Cele două lanţuri polideoxiribonucleotidice sînt unite prin legături de hidrogen între bazele pirimidinice şi purinice, care se află aşezate în interiorul spiralei duble, avînd planurile lor orientate perpendicular pe axa principală a moleculei de ADN. Ciclurile de deoxiriboză, legate prin resturi de fosfat, se situează la exteriorul spiralei duble(fig. 5.7). Atomul de oxigen al inelului deoxiribofuranozic este orientat în sus într-un lanţ

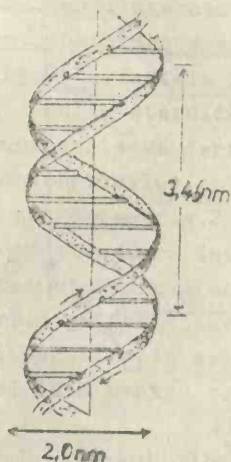


Fig.5.7.Schema spiralei duble a moleculei de ADN. Cele două benzi simbolizează catenele deoxiriboză-fosfat,iar barele orizontale - perechile de baze azotate.

și în jos în cel de al doilea lanț(fig.5.8A). Legăturile de hidrogen între bazele azotate în molecula ADN se realizează numai între adenina unui lanț și timina lanțului opus și între guanina primului lanț și citozina celuilalt lanț (fig.5.8 și 5.9).Legăturile de hidrogen în perechile de baze azotate pot fi de două tipuri: -N-H---N= și -N-H---O- .In ambele cazuri donor de hidrogen este grupa -N-H sub formă amino sau imino(fig.5.9).Formarea perechilor adenină - timină și guanină - citozină este condiționată de spațiul de 1,09 nm cît ocupă o bază pirimidinică cuplată cu o bază purinică și de numărul maxim de legături de hidrogen între bazele azotate(două între adenină și timină și trei între guanină și citozină)(fig.5.9).Rezultă că macromolecula ADN se compune din două lanțuri polideoxiribonucleotidice complementare unul față de altul,dar nu identice.In raport cu legăturile internucleotidice,catenele au un sens opus,adică sînt antiparalele(fig. 5.8),punțile fosfodiesterice realizîndu-se între C-3' și C-5' pe o catenă și între C-5' și C-3' pe catena complementară(datorită orientării opuse a oxigenului deoxiribozei din cele două catene).Fiecare catenă prezintă un capăt 3' și un altul 5',ultimul avînd atașat fosfatul. In stabilizarea moleculei bicatenare a ADN un rol foarte mare revine,de asemenea,forțelor van der Waals care iau naștere între bazele azotate datorită stivuirii lor pe verticală,ca și „monedele într-un fișic".

Spirala dublă(dublu helixul) ADN se caracterizează prin următorii parametri.Pasul(un tur complet) dublu helixului măsoară 3.46 nm și conține 10 perechi de deoxinucleotide.Diametrul dublu helixului are valoarea apropiată de 2,0 nm.

ADN bicatenar,în dependență de condițiile înconjurătoare(na-

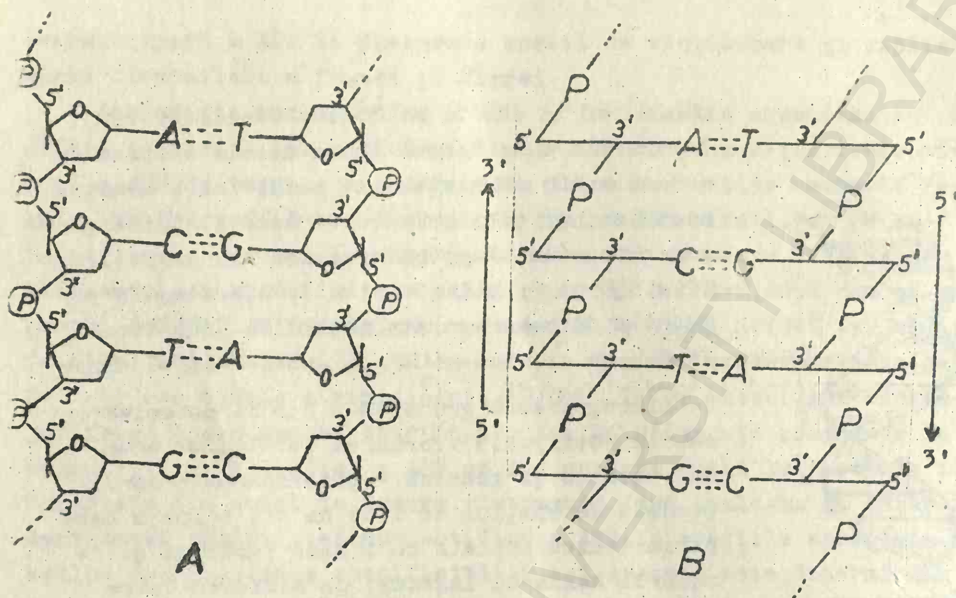


Fig.5.8.Orientarea antiparalelă a celor două catene polideoxiribonucleotidice în molecula ADN.
Liniile întrerupte reprezintă legăturile de hidrogen între bazele azotate.

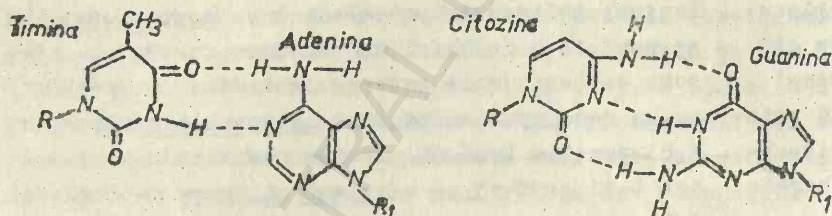


Fig.5.9.Imperecherea complementară a bazelor pirimidinice şi purinice prin legături de hidrogen în molecula ADN.

tura ionului metalic şi umiditatea relativă),de asemenea,în funcţie de secvenţa şi compoziţia nucleotidică,poate dobîndi o organizare structurală determinată.In prezent se cunosc mai multe conformaţii(forme) ale moleculei de ADN: A,B,C etc.Toate aceste spirale duble sînt orientate spre dreapta.Forma B,descrisă mai sus(fig. 5.7),există în ADN nativ şi în soluţiile apoase de ADN conţinînd ioni de sodiu.Forma B se transformă în forma A în prezenţa ionilor de Na^+ şi la o umiditate relativă de 75%.Această formă posedă 11 perechi de nucleotide într-o răsucire completă.Perechile de baze

azotate,de asemenea,sînt aproape plane,însă înclinate cu 20^o față de planul perpendicular pe axa spiralei.Forma C,specifică sării de Li a ADN natural în condiții de umiditate relativă joasă(44-66 %),are pasul spiralei duble de 3,31 nm și 9 perechi de baze în fiecare spiră.Pe lîngă modificațiile polimorfe tradiționale ale ADN,s-a descoperit și o familie de spirale de stînga(Z-ADN),ceea ce dovedește încă o dată natura „cameleonică" a ADN și capacitatea lui de adaptare.Denumirea de Z-ADN provine de la faptul că linia de legătură între resturile de fosfat are un aspect de zig-zag. Spiralele duble de tip Z conțin 12 perechi de nucleotide într-o spiră și au pasul de 4,46 nm.Rolul biologic al Z-ADN încă nu este clar.Posibil,apariția Z-ADN în genom se corelează cu reglarea expresiei genelor.Z-ADN a fost descoperit în cromozomii uriași de drosofila și probabil participă în reglarea superspiralizării ADN.

La marea majoritate a organismelor,ADN se află sub formă liniară,bicatenară,dublu-elicoidală.Insă moleculele ADN pot să existe și sub formă circulară monocatenară sau bicatenară.Ciclizarea moleculei de ADN se realizează necovalent prin punți de hidrogen între bazele azotate terminale complementare sau pe cale covalentă prin stabilirea unei legături între deoxiriboza capătului 3'și restul de acid fosforic de la capătul 5'.Forma ciclică monocatenară a ADN se întîlnește la unele virusuri,în special la virusurile care atacă <u>Escherichia coli</u>.Moleculele ciclice bicatenare de ADN se descoperă la diferite bacterii,în unele organite celulare (mitocondrii,cloroplaste) etc.

Macromoleculele ARN sînt obișnuit monocatenare,conținînd un singur lanț poliribonucleotidic.In funcție de natura și succesiunea ribonucleotidelor pe care le conține,lanțul poliribonucleotidic se pliază astfel încît bazele azotate ale unui număr de ribonucleotide dintr-o parte a moleculei formează punți de hidrogen cu bazele ribonucleotidelor situate pe altă porțiune a lanțului. In urma acestei interacțiuni între bazele azotate,pe alocuri,se obțin zone bicatenare,dublu elicoidale,care alternează cu zone nespiralate ale aceluiași lanț poliribonucleotidic.Porțiunile spiralate sînt menținute prin punți de hidrogen între perechile de baze azotate complementare: adenină-uracil,guanină-citozină.Regiunile monocatenare se prezintă sub formă de „bucle" și sînt limitate

de punţi de hidrogen.Această structură secundară a ARN răspunde cerinţelor lor funcţionale.La unele virusuri(reovirus,virusul tumorilor pricinuite plantelor de răni etc.) materialul genetic este reprezentat de ARN bicatenari.

5.2.3.Structura terţiară a AN.Moleculele AN pot adopta conformaţii spaţiale caracteristice sub formă de superspirale,cunoscute sub denumirea de structură terţiară.Astfel la unele virusuri (de exemplu,virusul polioma),în mitocondrii se întîlneşte ADN superspiralizat.In cromatina şi cromozomii eucariotelor,ADN,de asemenea, se află în stare superspiralizată.La această stare concură proteinele din deoxiribonucleoproteine,sub forma cărora ADN există în aparatul nuclear.

Structura terţiară a ARN a fost cel mai detaliat studiată în cazul ARN de transfer.

5.2.4.Organizarea moleculară a ADN în cromozomi.ADN are o complexitate şi organizare structurală diferită la procariote şi eucariote.Aşa cum s-a menţionat,bacteriile conţin ADN cel mai adesea (dacă nu totdeauna) sub forma unei molecule inelare(sau cel puţin cvasiinelare).In unele bacterii,ca E.coli,ADN inelar cromozomial are lungimea conturului de 1,36 nm,ceea ce corespunde la 4.10^6 perechi de deoxinucleotide şi $M=2,8.10^9$.Evident că,molecula ADN în cromozomul bacterian trebuie să se compactizeze puternic.Acest scop se realizează cu ajutorul unei structuri deosebite,numită miez,în compoziţia căreia intră ARN şi proteine;interacţionînd cu miezul,ADN se condensează şi formează spirale împachetate compact. Pe lîngă ADN cromozomial principal în celulele bacteriene se întîlnesc molecule circulare de ADN cu $M=10.10^6$,numite plasmide.Acestea au dobîndit o importanţă excepţională în calitate de vectori în ingineria genetică.

La eucariote - animale şi plante - ADN intră predominant în compoziţia cromozomilor din nucleul celulei.In celulele diferitelor organisme se găseşte un număr variabil de cromozomi.De exemplu,în celulele omului sînt prezenţi 46 cromozomi,fiecare conţinînd o moleculă de ADN cu lungimea medie de 4 cm.Dacă toate moleculele ADN celular s-ar uni una cu alta,s-ar obţine un fir cu lungimea de circa 2 cm;masa moleculară sumară a ADN este de 4.10^{12},ceea ce echivalează cu $5,5.10^9$ perechi de deoxinucleotide.

In cromozomii eucariotici ADN se află asociat cu ARN,proteine,mici cantităţi de lipide şi ioni metalici(Mg^{2+}, Ca^{2+}),într-o arhitectură supermoleculară complexă denumită cromatină.Intre proteinele cromatinei se remarcă proteinele bazice numite histone şi proteinele nonhistonice,în majoritatea lor proteine acide.Raportul cantitativ ADN/histone în cromatină este egal 1.

Histonele sînt proteine cu un conţinut ridicat de aminoacizi bazici(Lys,Arg,His).In cromatina celulelor eucariote s-au descoperit cinci fracţiuni principale de histone: H1,H2A,H2B,H3 şi H4, care se deosebesc după masa moleculară,numărul total de aminoacizi şi numărul resturilor de aminoacizi bazici(tabelul 5.3).

Tabelul 5.3.Proprietăţile moleculare ale histonelor

Histona	Masa moleculară	Numărul resturilor de aminoacizi			
		Total	AA bazici*	Lizină	Arginină
H1	21.500	220	65	62	3
H2A	14.000	129	30	14	12
H2B	13.800	125	30	20	8
H3	15.300	135	33	13	18
H4	11.300	102	26	11	14

*Lys,Arg şi His

Structurile primare ale histonelor H3 şi H4 din diferite organisme animale şi vegetale se aseamănă foarte mult între ele,diferind prin 4 şi respectiv 2 aminoacizi din cei 135 şi corespunzător 102 existenţi în moleculele acestor histone.

Structura primară a H1 ar prezenta specificitate de specie.

Conform studiilor electronomicroscopice fibra de cromatină din cromozomii interfazici are aspectul unui colier de mărgele, fiind formată din unităţi repetitive,aproape sferice,cu diametrul de 10 nm,unite între ele prin segmente flexibile.In prezent aceste unităţi fundamentale de organizare moleculară a cromatinei se cunosc sub numele de nucleosomi.Fiecare nucleosom reprezintă un ansamblu molecular alcătuit dintr-un complex globular conţinînd cîte două molecule din histonele H2A,H2B,H3 şi H4(octamer histonic),în jurul căruia se înfăşoară dublu helixul de ADN formînd 1,75 superspirale de stînga.Nucleosomii sînt uniţi între ei prin spirala bicatenară de ADN(ADN linker sau de legătură).Cu porţiunile de „intrare" şi „ieşire" ale ADN internucleosomic vine în contact o moleculă de histonă H1 care se fixează cu regiunea sa globulară,lateral,la exteriorul nucleosomului,pe ADN linker.Capetele N- şi C-terminale ale moleculei de H1 se ancorează de nu-

cleosomii adiacenţi.La diferite organisme şi tipuri de celule fiecărui nucleosom îi revin 160-250 perechi de deoxinucleotide per octamerul histonic,în medie 200 perechi de deoxinucleotide din dublu-helixul de ADN.Prin hidroliza cromatinei cu nuclează micrococală s-a reuşit să se izoleze particule nucleosomale fără histona H1,conţinînd un fragment de ADN de 146±1 perechi de deoxinucleotide,care au primit denumirea de miezul nucleosomului.Asamblarea celor opt molecule de histone în miezul nucleosomic conduce la un disc asemănător unei inimi în care partea centrală şi vîrful inferior sînt formate din tetramerul 2H3+2H4,iar proeminenţele superioare de cei doi dimeri 2H2A şi 2H2B.Octamerul histonic se stabilizează prin interacţiuni hidrofobe între fragmentele C-terminale ale histonelor,iar capetele lor N-terminale bogate în resturi de arginină şi lizină se dispun pe suprafaţa octamerului,legîndu-se cu ADN care se înfăşoară pe miezul histonic.Superspiralizarea dublu helixului de ADN în jurul octamerului histonic ar fi determinată de histonele H3 şi H4.Toate histonele(cu excepţia histonei H1) interacţionează cu ADN în aşa mod încît neutralizează sarcinile negative doar de pe o parte a spiralei duble;pe partea opusă respingerea sarcinilor negative ale grupelor fosfat se menţine şi facilitează cutarea moleculei de ADN în jurul miezului histonic.

Nucleosomii constituie numai primul nivel de condensare a ADN.Fibra de cromatină naturală are un diametru de 2-3 ori mai mare decît al nucleosomului.Rezultă că filamentul nucleosomal de cromatină se împachetează într-o structură şi mai compactă - fibra de cromatină de 30 nm.Pentru descrierea arhitecturii moleculare a acestor fibre s-au propus cîteva modele.Conform unuia din modele(J.T.Finch şi A.Klug,1976),bazat pe cercetările electronomicroscopice,fibra de cromatină cu diametrul de 10 nm se spiralizează într-o structură solenoidală cu diametrul de 25-30 nm şi înălţimea pasului de 11 nm.Fiecare spiră a solenoidului conţine 6 nucleosomi(fig.5.10).Aceştia sînt astfel dispuşi în solenoid,încît moleculele histonei H1 se află în centrul lui.Interacţiunea moleculelor de histonă H1 contribuie la stabilizarea structurii solenoidale a cromatinei.

După un alt model(A.Worcel,S.Strogatz,D.Riley,1981),se presupune că unitatea repetitivă în structura fibrei de cromatină de

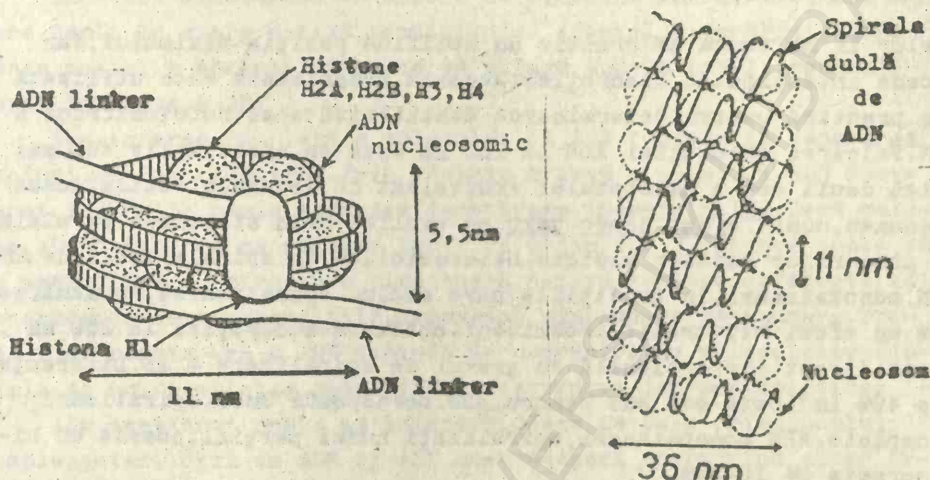


Fig.5.10.Schema unui nucleosom(a) şi schema împachetării fibrei de cromatină în solenoid(b).

30 nm este nu nucleosomul,ci un dimer(<u>nucleodisomul</u>) din două elemente aşezate în zig-zag ale fibrei de 10 nm.Prin înfăşurarea acestei fibre în jurul axei se formează o spirală cilindrică cu diametrul de 25-30 nm,în centrul căreia se localizează ADN linker (spacer) într-o formă condensată.Pe suprafaţa laterală a spiralei există un jgheab unde se poate fixa histona H1 care,de asemenea, va stabiliza structura generală.

Există indicaţii că formaţiunile solenoidale se organizează în structuri încă mai complexe care pot da o condensare suplimentară a cromatinei,ducînd la individualizarea morfologică a cromozomilor.Detaliile mecanismului de împachetare a cromatinei în structura finală a cromozomilor constituie probleme importante care urmează să le rezolve generaţiile următoare de biochimişti.In cromozomi cromatina este fixată la o carcasă din proteine nonhistonice care formează partea centrală a edificiului.Gradul de condensare a ADN în cromozomii metafazici atinge valoarea de 5.000-10.000 .

5.3.<u>Unele proprietăţi fizico-chimice ale AN</u>

Bazele pirimidinice şi purinice,nucleozidele şi nucleotidele corespunzătoare posedă un maxim de absorbţie a luminii în domeniul ultraviolet,la 260 nm(citozina - la 270 nm).Incatenarea nucleoti-

delor în molecula AN practic nu modifică poziţia maximului,dar scade intensitatea absorbţiei.Această proprietate este utilizată în practică pentru determinarea cantitativă spectrofotometrică a AN.Valoarea absorbţiei ADN la 260 nm este cu aproximativ 40% mai mică decît cea a amestecului echivalent de deoxinucleotide.Acest fenomen,numit efect hipocromic,se explică prin stivuirea paralelă a planurilor bazelor azotate heterociclice în spirala dublă de ADN; AN monocatenari,în condiţiile care exclud spiralizarea,nu manifestă un efect hipocromic proeminent.Scăderea absorbţiei la 260 nm este direct proporţională cu gradul de spiralizare a AN.Diferenţa de 40% indicată mai sus pentru ADN corespunde unei spiralizări complete.ARN monocatenari,spiralizaţi numai parţial,posedă un hipocromis de 10-20%.

Denaturarea AN constă în perturbarea legăturilor de hidrogen şi forţelor van der Waals între bazele azotate ale lanţurilor polinucleotidice.Ca rezultat al acestui proces are loc separarea lanţurilor din spirala dublă a ADN şi a fragmentelor bicatenare din molecula ARN,fiecare lanţ luînd forma unui ghem cu o înfăşurare dezordonată.Denaturarea AN poate fi cauzată de: temperatură, modificarea pH,scăderea forţei ionice,uree etc.Denaturarea termică a acizilor nucleici prezintă un caracter cooperant,adică în tranziţia de la o stare în altă stare participă un număr mare de interacţiuni şi fiecare interacţiune anterioară creşte probabilitatea de desfăşurare a următoarei interacţiuni.Intrucît interacţiunile între bazele azotate ale celor două lanţuri polinucleotidice sînt cooperante,asemănător interacţiunilor între molecule într-un cristal,structura spiralată ordonată se distruge într-un interval restrîns de temperatură.De aceea denaturarea AN bicatenari sub acţiunea temperaturii se numeşte „topire".La un moment determinat al denaturării cantitatea porţiunilor spiralate este egală cu a porţiunilor nespiralate.Temperatura la care are loc denaturarea AN în proporţie de 50% se numeşte „temperatură de topire"(T_m).

Preparatele de ADN din diferite surse au T_m variate,care depind aproape liniar de conţinutul G+C.Cu cît este mai mare cantitatea G+C cu atît AN manifestă o stabilitate crescută la agenţii denaturanţi.T_m a poliribonucleotidelor bispiralate este mai mare decît a polideoxiribonucleotidelor.

In stare denaturată AN absorb în domeniul ultraviolet mai intens decît în stare nativă,condiţionînd efectul hipercromic.Creşterea maximă a absorbţiei poate să atingă 80% în cazul despiralizării complete a AN.

Denaturarea completă a moleculei de ADN conduce la separarea lanţurilor complementare.Prin răcirea bruscă a soluţiei ADN denaturat,lanţurile rămîn separate(denaturare ireversibilă).Dacă soluţia ADN denaturat se răceşte încet cu puţin sub T_m,atunci poate să se restabilească structura bicatenară nativă.Aceasta dovedeşte că denaturarea este reversibilă,fenomenul numindu-se renaturare.Procesul de renaturare a ADN depinde de concentraţia moleculelor iniţiale şi uniformitatea,omogenitatea secvenţei lor nucleotidice.

ADN denaturat poate să interacţioneze pe baza principiului complementarităţii cu ADN şi ARN monocatenari aparţinînd altor organisme.Dacă se va amesteca produşii de denaturare ai acizilor nucleici de diverse provenienţe,atunci în condiţiile renaturării se vor forma molecule bicatenare atît din lanţurile omoloage cît şi din lanţurile diferite.Acest tip particular de renaturare se numeşte hibridare moleculară,întrucît conduce la formarea de molecule hibride: ADN-ADN şi ADN-ARN.Metoda hibridării se foloseşte pentru cercetarea poziţiei taxonomice şi înrudirii genetice a diferitelor organisme,permiţînd elucidarea unor probleme dificile ale taxonomiei şi evoluţiei.Hibridarea moleculară a dat impulsul iniţial investigaţiilor de perspectivă în domeniul ingineriei genetice,urmărind construirea în afara organismului a moleculelor recombinante(hibride) biologic active de ADN.

5.4.Funcţiile biologice ale AN

Ipoteza privind funcţia genetică a AN a fost formulată încă la sfîrşitul secolului trecut.Insă ea a fost definitiv acceptată abia după experienţa clasică a lui O.T.Avery,C.M.McLeod şi M.Mc Carty(1944).Ei au extras ADN din pneumococul de tip virulent(colonii S: smooth=neted) şi l-au adăugat la suşa nevirulentă a acestei bacterii(colonii R: rough=aspru).S-a constatat că are loc transformarea celulelor R în celule S care sînt stabile şi se descoperă în generaţiile următoare.Cercetările efectuate de A.Hershey şi Martha Chase(1952) au dovedit rolul ADN în reproducerea virusurilor.Cu ajutorul izotopilor radioactivi aceşti autori au stabilit

că la parazitarea bacteriilor de către virusuri,în celula bacteriană pătrunde ADN.Experienţele realizate independent în 1956 de H.Fraenkel-Conrat pe de o parte şi de A.Gierer şi G.Schramm,pe de alta,au relevat că ARN extras din virusul mozaicului tutunului (VMT),de asemenea,pos[illegible] proprietăţi infecţioase.

In prezent nu ma[illegible] [illegible]istă nici un dubiu că AN constituie substratul biochimic al genelor,care deţin sub formă codificată informaţia ereditară a organismului.ADN este purtătorul caracterelor ereditare la eucariote şi la marea majoritate a procariotelor. ARN îndeplineşte funcţia de stocare şi transmitere a informaţiei genetice la o serie de virusuri,cum ar fi virusurile diferitelor bacterii(bacteriofagul MS_2,f_2,Q ,R etc.),unele virusuri ale plantelor(VMT,virusul mozaicului alfa etc.) şi animalelor(virusul poliomielitic,gripal etc.).

ADN transmite informaţia genetică pe două căi.Prima cale - de la ADN la ADN,asigură replicarea acestuia şi transmiterea informaţiei genetice din generaţie în generaţie,cînd are loc înmulţirea organismelor.După cea de a doua cale,ADN transmite informaţia pentru coordonarea activităţii metabolice a celulei,care se exprimă în procesul de biosinteză a proteinelor.Cu alte cuvinte, molecula ADN poartă informaţia necesară pentru sinteza proteinelor specifice,caracteristice unui sau altui organism.Transferul informaţiei de la ADN la sistemul de sinteză a proteinelor se realizează prin intermediul acizilor ribonucleici.

5.4.1.Tipuri de ARN celulari.ARN mesager(mARN=ARNm).ARNm numit încă ARN informaţional sau ARN matricial constituie circa 5% din ARN celular şi are o durată scurtă de viaţă.Masa moleculară a ARNm oscilează între 300.000-2.000.000 D.Sinteza ARNm are loc în nucleul celulei şi foloseşte ca matriţă un segment al uneia din catenele dublu helixului de ADN.Acest segment din ADN poate corespunde la o genă sau la mai multe gene care deţin informaţia genetică pentru sinteza unor proteine sau enzime cu funcţii conexe.Din nucleu ARNm sintetizat trece în citoplasmă,unde serveşte drept matriţă în sinteza proteinelor,fiind purtătorul mesajului genetic de la ADN la ribozomi - sediul sintezei proteinice.

ARN ribozomal(rARN=ARNr).ARNr constituie aproximativ 80% din cantitatea totală de ARN celular.ARNr este componentul major al

ribozomilor. Aceştia sînt organite foarte complexe şi în funcţie de provenienţa lor conţin 3-4 tipuri de ARNr şi 50-100 molecule de proteine specifice(tabelul 5.4).

Tabelul 5.4. Componenţii ribozomilor de diferite provenienţe

Subunitatea mare			Subunitatea mică		
S	Numărul de proteine	Tipul de ARNr	S	Numărul de proteine	Tipul de ARNr
		Procariote: Ribozomul bacterian 70S			
50 S	34	5S 23S	30 S	21	16S
		Eucariote:			
		Citoplasma: ribozomul 80S			
60 S	45-60	5S 5,8S 28S	40 S	30	18S
		Cloroplaste			
50 S	30-35	4S 5S 7S* 23S	30 S	20-25	16S
		Mitocondrii**			
40S - 60S	32-52	5S*** 12S-21S	30S-55S	24-30	12S-15S

S - coeficient de sedimentaţie;

* - subunitatea mare a ribozomilor din cloroplaste, pe lîngă ARNr 23S şi 5S, conţine un ARNr suplimetar ale cărui dimensiuni variază la diferite specii;

** - ribozomii din mitocondrii se caracterizează printr-o puternică variabilitate a structurii lor la diferite organisme;

*** - ARNr 5S intră în compoziţia subunităţii mari a ribozomilor mitocondriali numai la plantele superioare.

ARN ribozomali liberi posedă atît structură secundară cît şi structură terţiară. Deşi la formarea ribozomului are loc o compactizare puternică a ARNr, structura lor secundară se modifică puţin. De aici se poate presupune că factorul principal care ar stabiliza subunităţile ribozomale trebuie să fie interacţiunile între ARNr şi proteine. Pe lîngă rolul în asamblarea structurilor ribonucleo-

proteinice ribozomale,ARNr sînt implicaţi în legarea ARNm la ribozomi şi în translaţia lui.

ARN de transfer(tARN=ARNt).ARNt reprezintă 10-20% din ARN celulei.Masa moleculară a ARNt este comparativ mică,de ordinul a 25.000 D.Molecula A conţine de la 75 la 90 ribonucleotide.Intre ele se întîlnesc nu ...ai cele patru tipuri principale de ribonucleotide,ci şi aproximativ 10% de ribonucleotide „rare" sau minore;unele din ele se indică în fig.12. .Funcţia biochimică a ARNt în celula vie constă în transferul aminoacizilor activaţi spre locul de biosinteză a proteinelor.In celula vie există cel puţin cîte un ARNt specific pentru fiecare din cei 20 de aminoacizi din moleculele proteinelor.Fiecare ARNt diferă de ceilalţi prin secvenţa ribonucleotidelor.Structura primară a ARNt generează structura lor secundară care este asemănătoare după formă cu „frunza de trifoi"(fig.5.11).In unele poziţii din catena poliribonucleotidică a tuturor ARNt totdeauna se găsesc aceleaşi ribonucleotide;ele se numesc invariabile şi participă în principal la formarea structurii terţiare a ARNt.O trăsătură comună a tuturor speciilor de ARNt este secvenţa trinucleotidică pCpCpA(CCA) la capătul 3' al catenei poliribonucleotidice.La grupa 3'-OH a ribozei AMP din succesiunea pCpCpA,existentă în toţi ARNt,se ataşează printr-o legătură esterică aminoacidul ce urmează să fie transferat la nivelul ri...zomilor.

Legarea ARNt cu aminoacidul îiconferă ultimului capacitatea de a se integra în polipeptida sintetizată la locul indicat de codonul specific al ARNm(vezi Codul genetic).Recunoaşterea codonului ARNm se face prin secvenţa trinucleotidică din lanţul poliribonucleotidic al ARNt,numită anticodon(fig.5.11).Arhitectura rigidă a anticodonului favorizează interacţiunea lui cu codonul ARNm pe calea formării unei minispirale duble între ribonucleotidele complementare.

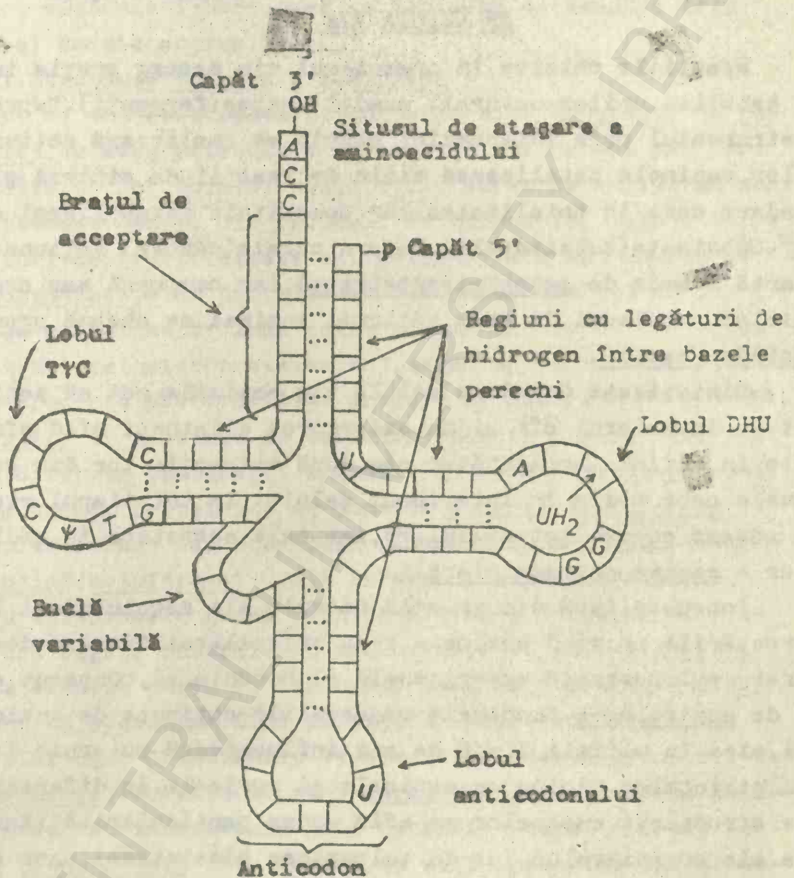


Fig.5.11. Structura secundară, tip „frunză de trifoi" a tARN.
Nucleotidele indicate ocupă aceleaşi poziţii în moleculele aproape tuturor tARN. DHU(UH_2) - acid dihidrouridilic, T - acid ribotimidilic, Ψ - acid pseudouridilic. Liniile întrerupte desemnează legăturile de hidrogen ce apar între bazele azotate complementare A-U şi G C.

6. ENZIME - CATALIZATORII REACTIILOR CHIMICE IN CELULA VIE

Reacţiile chimice în organismul viu decurg graţie intervenţiei catalizatorilor naturali numiţi enzime(fermenţi).Reprezentînd instrumentul prin intermediul căruia se realizează activitatea genelor,enzimele catalizează miile de reacţii de sinteză şi de degradare care în totalitatea lor constituie metabolismul substanţelor.Substanţa(substanţele) asupra căreia(cărora) acţionează enzima poartă numele de substrat(substrate),iar compusul sau compuşii chimici rezultaţi în urma acţiunii enzimei se cheamă produs(produşi)de reacţie.

Sintetizate de către celula vie,enzimele pot să acţioneze atît în interiorul cît şi în exteriorul ei,atunci cînd sînt eliberate în mediul înconjurător sau după extracţia lor din celulă.Enzimele care rămîn în interiorul celulei în tot timpul vieţii ei se numesc enzime intracelulare,iar cele secretate în mediul exterior - enzime extracelulare.

Incepute,încă din primele decenii ale secolului al XIX-lea, cercetările privind enzimele s-au cristalizat într-un domeniu separat de importanţă excepţională al biochimiei,cunoscut sub numele de enzimologie.Succesele remarcabile obţinute de enzimologie, mai ales în ultimii 30-40 de ani influenţează puternic dezvoltarea ştiinţelor biologice,medicale şi agricole.In diferenţele fine ale structurii enzimelor se află cauza particularităţilor de specie ale organismelor,iar în tulburarea biosintezei unor enzime - punctul de plecare în apariţia bolilor ereditare şi de altă natură.Influenţa hormonilor,medicamentelor,toxinelor bacteriene,factorilor fizici etc. asupra proceselor metabolice şi funcţiilor fiziologice în organismul viu se realizează pe calea modificării activităţii enzimelor şi vitezei reacţiilor catalizate de ele.Pe proprietatea enzimelor de a-şi păstra funcţiile specifice în afara celulei,se bazează utilizarea lor practică în industria chimică,alimentară,uşoară,farmaceutică.In ultima perioadă de timp,în diferite ramuri industriale,în farmacie,medicină etc. se folosesc pe scară tot mai largă enzimele imobilizate artificial pe anumite suporturi anorganice sau organice,naturale şi de sinteză.Enzimele

imobilizate îşi păstrează specificitatea şi activitatea caracteristice pentru enzimele libere,însă le depăşesc pe acestea prin stabilitatea şi durata acţiunii lor.

6.1.Structura chimică a enzimelor

Din punct de vedere structural,enzimele sînt substanţe de natură proteinică,cu masa moleculară de sute şi mii de ori mai mare decît a catalizatorilor chimici obişnuiţi.O serie de enzime au moleculele constituite numai din radicali de aminoacizi legaţi între ei prin legături peptidice.Aceste enzime,cunoscute sub numele de enzime monocomponente,sînt proteine simple(holoproteine) de tipul albuminelor şi globulinelor.Insă multe enzime fac parte din clasa proteinelor complexe(heteroproteinelor),avînd moleculele alcătuite dintr-o componentă proteinică şi o grupare de natură neproteinică, denumită cofactor. In calitate de cofactori pot participa unii ioni metalici sau diferite combinaţii organice cu mase moleculare mici. De obicei componenta proteinică se numeşte apoenzimă (apoferment). Intregul complex format din apoenzimă şi cofactor a primit denumirea de holoenzimă(holoferment).Unii cofactori se eliberează din complecşii cu apoenzimele numai prin denaturarea holoenzimelor.Aceşti cofactori legaţi puternic cu apoenzimele se numesc grupări prostetice.Ca exemplu poate fi dat hemul care în citocromul c se leagă covalent cu apoenzima.Cînd cofactorii reprezintă derivaţi organici şi sînt uşor disociabili de apoenzime poartă denumirea de coenzime(cofermenţi).Cofactorii sînt termostabili,în timp ce majoritatea enzimelor se inactivează prin încălzire.Caracteristic pentru enzimele bicomponente este faptul că atît apoenzima cît şi cofactorul sau coenzima,în stare separată,nu posedă activitate catalitică.Numai complexul lor manifestă proprietăţile specifice enzimei date.

Acţiunea catalitică a enzimelor este condiţionată de existenţa în moleculele lor a unor regiuni distincte,denumite situsuri active sau catalitice.In cazul enzimelor monocomponente situsul (centrul) activ reprezintă o asociere unică a radicalilor de anumiţi aminoacizi aflaţi în zone diferite ale lanţului polipeptidic. In compoziţia situsurilor active se întîlnesc frecvent resturile de serină,cisteină,acid aspartic,acid glutamic,lizină,arginină,tirozină,histidină,triptofan.Prin plierea catenei polipeptidice

într-o conformaţie nativă,stabilă a enzimei,aminoacizii participanţi la formarea centrului activ sînt grupaţi într-o geometrie spaţială,la nivelul căreia se află grupele funcţionale implicate în legarea directă a substratului şi în transformarea catalitică a acestuia.Modificarea structurii terţiare a protein-enzimei sub influenţa diverşilor factori poate să conducă la deformarea centrului activ şi la pierdera activităţii catalitice.Situsurile active ale enzimelor bicomponente cuprind pe lîngă aminoacizii respectivi, de asemenea,coenzima sau gruparea prostetică,care interacţionează cu substratul şi facilitează desfăşurarea reacţiei enzimatice.Unele enzime bicomponente conţin în situsurile active ioni metalici. Ele se încadrează în clasa metaloenzimelor.

Centrul catalitic este localizat în porţiunea internă,hidrofobă a moleculei de protein-enzimă,porţiune care oferă condiţii optime pentru efectuarea catalizei enzimatice.Venind în contact cu centrul activ substratul se află în apropiere directă cu grupele funcţionale specifice ale enzimei,a căror acţiune cooperantă slăbeşte anumite legături din molecula substratului,transformîndu-l într-o combinaţie chimică mai reactivă.

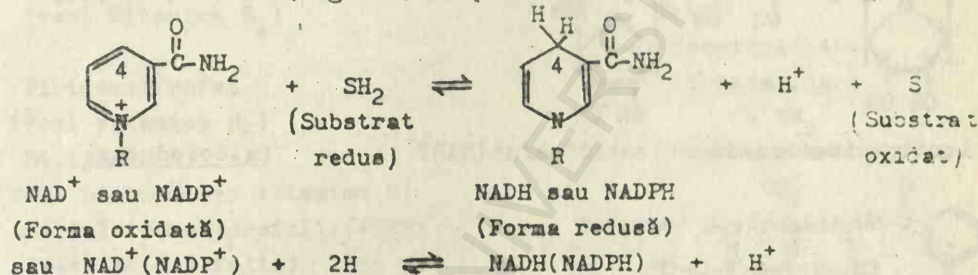
In molecula enzimei există aminoacizi care nu intră în constituţia centrului catalitic.Interacţiunea acestor aminoacizi determină conformaţia întregii molecule de enzimă şi geometria spaţială a centrului activ.Deci,în actul catalitic ia parte întreaga moleculă de enzimă.

O serie de enzime,în special cele oligomere,constituite din două sau mai multe subunităţi,conţin în molecula lor pe lîngă centrul activ şi un al doilea centru numit centru(situs) allosteric. Fixarea unei anumite substanţe micromoleculare în centrul allosteric al enzimei conduce la schimbarea structurii terţiare a moleculei proteinice.Această schimbare poate afecta puternic stabilitatea enzimei,de asemenea,geometria spaţială a centrului activ,ceea ce va determina stimularea sau diminuarea activităţii catalitice.Enzimele posedînd atît centru activ cît şi centru allosteric se denumesc enzime allosterice.

6.1.1.Coenzime.Coenzimele acţionează ca acceptori sau donori de atomi sau de grupe funcţionale care se scindează de la substrat sau se unesc la acesta.Intre coenzime se numără vitamine hidroso-

lubile şi derivaţii lor, nucleotide, unele peptide, esterii fosforici ai unor monoglucide etc. (tabelul 6.1). Una şi aceeaşi coenzimă, unindu-se cu apoenzime diferite, poate să participe la reacţii chimice complet deosebite.

Coenzimele NAD^+, $NADP^+$, FMN şi FAD intră în compoziţia unor enzime care catalizează transferul hidrogenului în celula vie. Pentru NAD^+ şi $NADP^+$ gruparea funcţional activă este restul de nicotinamidă care în cataliza reacţiilor de oxido-reducere suferă o transformare reversibilă (fig. 6.1). In procesul de oxidare (dehidrogenare)

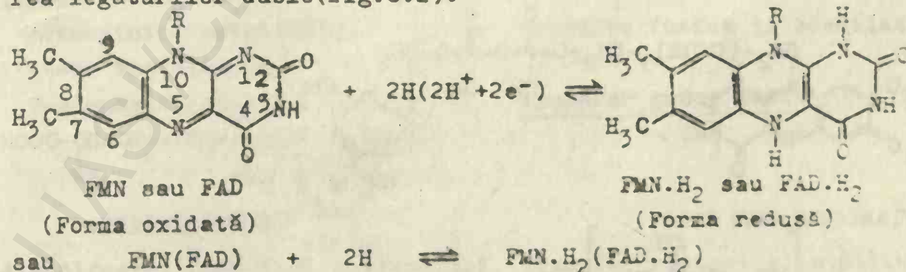


sau $NAD^+(NADP^+)$ + 2H ⇌ NADH(NADPH) + H^+

Fig.6.1. Reducerea reversibilă a coenzimelor nicotinamiddinucleotidice (NAD^+ şi $NADP^+$).

se scindează de la substrat 2H, unul din ei unindu-se în poziţia 4 a ciclului piridinic din molecula NAD^+ sau $NADP^+$, iar al doilea atom de H cedează electronul său azotului piridinic şi trece în mediul celular sub formă de proton.

Enzimele conţinînd în compoziţia lor FMN şi FAD se numesc <u>enzime flavinice</u> sau <u>flavoproteine</u>. In reacţia de reducere reversibilă a FMN şi FAD are loc adiţia a 2 atomi de H($2H^+ + 2e^-$) la atomii de azot N-1 şi N-5 din nucleul izoaloxazinic cu rearanjarea legăturilor duble (fig. 6.2).



sau FMN(FAD) + 2H ⇌ $FMN.H_2(FAD.H_2)$

Fig.6.2. Adiţia şi cedarea hidrogenului la nivelul ciclului izoaloxazinic al coenzimelor flavinice (FMN şi FAD).

Tabelul 6.1. Structura şi funcţiile principalelor coenzime

Coenzimă	Tipul de reacţie Grupă transferată
Nicotinamidadenindinucleotid (NAD^+) $C{-}NH_2$; $CH_2{-}O{-}P{-}O{-}P{-}O{-}CH_2$; OH OH ; Ade ; OH OH ; OH OH	Oxidoreducere H
[N]icotinamidadenindinucleotidfosfat($NADP^+$) $C{-}NH_2$; $CH_2{-}O{-}P{-}O{-}P{-}O{-}CH_2$; OH OH ; Ade ; OH OH ; OH $O{-}PO_3H_2$	Oxidoreducere H
Flavinmononucleotid (FMN) $CH_2{-}(CHOH)_3{-}CH_2{-}O{-}PO_3H_2$; H_3C ; H_3C ; N ; N ; N ; NH ; O ; O	Oxidoreducere H
Flavinadenindinucleotid (FAD) $CH_2{-}(CHOH)_3{-}CH_2{-}O{-}P{-}O{-}P{-}O{-}CH_2$; OH OH ; Ade ; H_3C ; H_3C ; N ; N ; N ; NH ; O ; O ; OH OH	Oxidoreducere H
Plastochinone $[CH_2{-}CH{=}C(CH_3){-}CH_2{-}]_n{-}H$; H_3C ; H_3C ; CH_3 ; O ; O	Oxidoreducere H

Tabelul 6.1(Continuare)

Coenzima Q (Ubichinona) H_3CO, H_3CO, CH_3 — $[-CH_2-CH=C(CH_3)-CH_2-]_n-H$	Oxidoreducere H
Tiamindifosfat(TPP) (vezi Vitamina B_1)	Transfer grupe aldehidice R-C=O şi decarboxilare
Piridoxalfosfat (Vezi vitamina B_6)	Transaminare $-NH_2$
Biotina (Vezi Biotina sau vitamina H)	Carboxilare CO_2
Acidul tetrahidrofolic(ATHF) (Vezi Acidul folic)	Transfer C_1-fragmente
Coenzima A (CoA sau CoA-SH) $HS-H_2C-H_2C-NH-C(=O)-H_2C-H_2C-NH-C(=O)-HC(OH)-C(CH_3)_2-H_2C-O-P(=O)(OH)-O-P(=O)(OH)-O-H_2C$ (riboză-Ade, 3'-O-PO_3H_2, OH)	Transfer grupe acil/ $R-C(=O)-$
Acid lipoic (Vezi Vitamine)	Oxidoreducere şi transfer acil
Coenzime cobamidice (Vezi Vitamina B_{12})	Transfer grupe alchilice
Adenozintrifosfat(ATP) (Vezi Nucleotide)	Transfer fosfat şi adenilat
S-Adenozilmetionina $HOOC-CH(NH_2)-CH_2-CH_2-S^+(CH_3)-H_2C$ (riboză-Ade, OH OH)	Transfer grupe metil $-CH_3$
Uridin-difosfat(UDP)(Vezi Nucleotide)	Transfer resturi glicozilice şi de acizi uronici
Citidin-difosfat(CDP) (Vezi Nucleotide)	Transfer fosforilcolină

6.2. Mecanismul reacţiilor enzimatice

Toate reacţiile chimice, inclusiv cele biochimice, decurg ca rezultat al ciocnirilor între moleculele reactanţilor. Numărul ciocnirilor intermoleculare conducînd la transformarea reactantului în produsul de reacţie depinde de energia moleculelor care reacţionează. Energia necesară pentru a conferi moleculelor respective capacitatea de a reacţiona se numeşte energie de activare. Ea reprezintă bariera energetică care trebuie depăşită pentru a se realiza reacţia dată. In fig. 6.3 este ilustrată diagrama profilului energetic în cursul reacţiilor catalizate şi necatalizate.

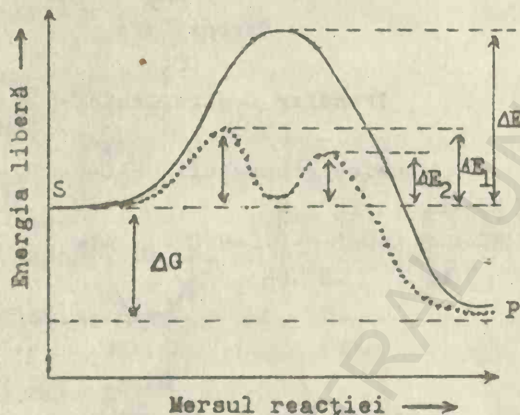


Fig. 6.3. Profilul energiei în reacţia necatalizată (——) şi în reacţia catalizată (...): S - substrat; P - produs de reacţie; ΔE - energia de activare în reacţia necatalizată; ΔE_1 şi ΔE_2 - energiile de activare în reacţia catalizată de enzimă; ΔG - diferenţa între energia moleculelor substanţei iniţiale şi energia produsului P.

Presupunem că are loc reacţia S $\rightleftharpoons$ P. In transformarea necatalitică a substratului S în produsul P, energia de activare a moleculelor iniţiale are valoarea ΔE. Dacă ΔE este foarte mare reacţia se desfăşoară cu viteză mică. In prezenţa enzimei, viteza de reacţie creşte considerabil. Ca toţi catalizatorii, enzimele pot accelera numai acele reacţii care termodinamic sînt posibile (se produc cu scăderea energiei libere), fără a modifica tipul lor. Stabilirea mult mai rapidă a echilibrului reacţiei catalizate de enzimă se poate explica prin creşterea reactivităţii substratului (substratelor) asupra căruia (cărora) acţionează. In cursul reacţiilor enzimatice enzima E se uneşte cu substratul S, formînd o combinaţie intermediară, numită complex enzimă-substrat ES. In acest complex se produc simultan două procese: a) schimbarea densităţii electronice, asociată cu polarizarea legăturilor şi b) deformarea geometrică a

unor legături atît în molecula substratului cît şi în centrul activ al enzimei.Polarizarea şi deformarea legăturilor favorizează depăşirea barierei de activare a stării de tranziţie a complexului enzimă-substrat.Formarea complexului ES constituie prima etapă a reacţiei enzimatice.In a doua etapă,complexul ES poate să disocieze din nou în substanţele iniţiale sau să se descompună în produsul de reacţie P şi enzima E.Succesiunea etapelor indicate se poate reda astfel:



$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \longrightarrow E + P \quad \text{sau} \quad E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + P \quad (6.1).$$

Fiecare etapă intermediară are o barieră energetică mult mai mică decît reacţia necatalizată.Pentru formarea complexului ES este necesară energia de activare ΔE_1,iar pentru descompunerea acestuia în E şi P - energia de activare ΔE_2.Integral,reacţia catalizată de enzimă se distinge prin valori mai mici ale energiei de activare decît reacţia corespunzătoare,necatalizată sau catalizată de catalizatori neenzimatici.Rezultă că enzimele scad energia de activare în reacţia pe care o catalizează,comparativ cu energia de activare în reacţia necatalizată.

Existenţa complexului ES se evidenţiază numai în cazul în care structura substratului este complementară steric cu structura spaţială a centrului activ al enzimei.Asocierea substratului cu centrul activ al enzimei se realizează atît prin legături covalente cît şi prin legături coordinative,interacţii hidrofobe şi electrostatice,legături de hidrogen etc.

6.3.Cinetica reacţiilor enzimatice

Cinetica enzimatică,ca parte a cineticii chimice,studiază dependenţa vitezei de reacţie de natura chimică a enzimei şi substratului şi de condiţiile interacţiei lor.

6.3.1.Influenţa concentraţiei enzimei asupra vitezei de reacţie.Inainte de orice,viteza reacţiei enzimatice depinde de concentraţia enzimei.Dacă concentraţia substratului este constantă, se observă o proporţionalitate directă între viteza de reacţie iniţială(cînd numai o cantitate foarte mică de S se transformă în P) şi concentraţiile crescînde ale enzimei.Această dependenţă liniară este caracteristică pentru majoritatea enzimelor.In anumite condiţii(prezenţa efectorilor,difuzia încetinită a moleculelor de substrat spre centrul activ al enzimei etc.) dependenţa menţionată

nu se mai păstrează.

6.3.2. Influenţa concentraţiei substratului asupra vitezei reacţiei enzimatice. Pentru majoritatea enzimelor, viteza de reacţie v variază cu concentraţia substratului [S] după o curbă cu aspect hiperbolic(fig.6.4). concentraţie constantă a enzimei, viteza de reacţie este proporţională cu concentraţiile mici de substrat. La concentraţii mari de substrat viteza de reacţie devine constantă, independentă de creşterea concentraţiei substratului. Dependenţa între viteza de reacţie enzimatică şi concentraţia substratului poate fi explicată pe baza teoriei elaborate de Leonor Michaelis şi Maud Menten(1913). Conform teoriei acestor autori, viteza de acţiune a unei enzime este determinată de concentraţia complexului specific ES care apare ca intermediar în cataliza enzimatică. Formarea complexului ES şi scindarea lui în enzima E şi produsul de reacţie P pot fi descrise de ecuaţia:

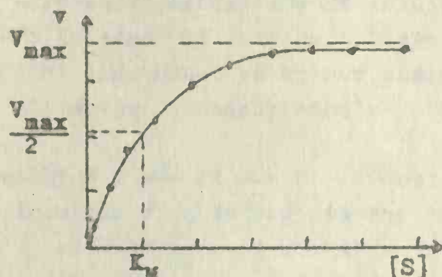


Fig.6.4. Graficul dependenţei între viteza de reacţie enzimatică v şi concentraţia substratului [S].



$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} E + P \quad (6.1),$$

unde k_1, k_2 şi k_3 sînt constantele de viteză ale reacţiilor indicate de săgeţi. Viteza reacţiei de formare a complexului ES este $v_f = k_1[E][S] = k_1([E_t]-[ES])[S]$. Viteza de descompunere a complexului ES este egală cu $v_d = k_2[ES] + k_3[ES] = (k_2 + k_3)[ES]$. In locul $[E]$ s-a luat $[E_t] - [ES]$, întrucît această diferenţă exprimă concentraţia enzimei libere cu care reacţionează substratul. Pentru majoritatea reacţiilor biochimice se aplică supoziţia stării staţionare a procesului, conform căreia vitezele de formare şi descompunere ale complexului ES sînt aproximativ egale; aceasta înseamnă că pentru o perioadă scurtă de timp, necesară pentru determinarea experimentală a vitezei, concentraţia ES rămîne practic constantă. Prin urmare în starea staţionară: $k_1([E_t] - [ES])[S] = (k_2+k_3)[ES]$. Rearanjînd termenii, această ecuaţie devine:

$$\frac{([E_t] - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_M \quad (6.2),$$

unde K_M se numeşte <u>constanta Michaelis</u>; ea este un parametru cinetic care defineşte afinitatea enzimei pentru un anumit substrat. Grupînd termenii ecuaţiei (6.2) rezultă expresia pentru $[ES]$: $[ES] = \frac{[E_t][S]}{K_M + [S]}$. Dacă se ţine seama că viteza reacţiei enzimatice $v = k_3[ES]$ şi că viteza maximă V_{max} se înregistrează cînd toată cantitatea de enzimă se află legată în complexul ES, $V_{max} = k_3[ES] = k_3[E_t]$, se obţine expresia finală pentru <u>ecuaţia Michaelis-Menten</u>: $v = V_{max}\frac{[S]}{[S] + K_M}$. Rezolvînd această ecuaţie în raport cu K_M se ajunge la relaţia: $K_M = [S](\frac{V_{max}}{v} - 1)$. După această relaţie constanta K_M are o semnificaţie concretă, identificîndu-se cu acea concentraţie a substratului (în moli/l) la care $v = V_{max}/2$. Cu ajutorul graficului din fig.6.4 se poate determina K_M, însă valoarea obţinută astfel este aproximativă. Pentru evaluarea mai precisă a K_M şi V_{max} din valorile vitezei obţinute experimental, ecuaţia Michaelis-Menten se prelucrează în următoarea ecuaţie liniară, numită <u>ecuaţia Lineweaver-Burck</u>: $\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$.

Graficul dependenţei între $1/v$ şi $1/[S]$ (fig.6.5) reprezintă o linie dreaptă a cărei pantă este egală cu K_M/V_{max} şi care interceptează ordonata în punctul $1/V_{max}$. Din acest grafic se pot afla uşor V_{max} şi K_M. Parametrul K_M al unei enzime depinde de substrat şi

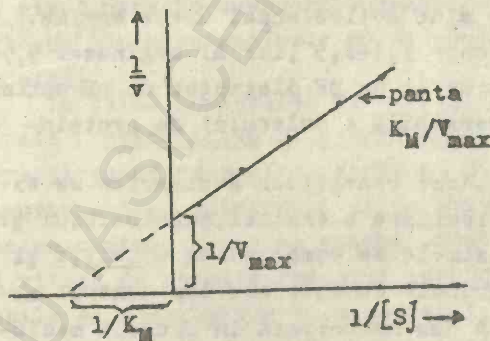


Fig.6.5. Reprezentarea grafică a reciprocei $1/v$ în funcţie de $1/[S]$ (graficul coordonatelor dublu-reciproce sau graficul Lineweaver-Burck).

condiţiile de reacţie.Valorile K_M pentru diferite enzime variază în limite foarte largi(10^{-1} - 10^{-8} M).O constantă K_M mare indică o afinitate mică a enzimei pentru substrat.Enzima cu K_M mică va manifesta în organismul viu o activitate mare,posibil chiar maximă.

6.3.3.Influenţa temperaturii asupra activităţii enzimelor. Viteza reacţiilor enzimatice,la fel ca şi a majorităţii proceselor chimice,creşte cu ridicarea temperaturii.In cazul enzimelor această creştere se observă într-un interval mic de temperatură.Valoarea maximă a vitezei de reacţie corespunde la temperatura optimă a enzimei.Dacă temperatura se măreşte în continuare are loc diminuarea rapidă a vitezei de reacţie prin denaturarea termică a enzimei.Temperatura optimă pentru diferite enzime nu este aceeaşi.In general,majoritatea enzimelor de origine animală prezintă o eficienţă catalitică maximă între 35° şi 40°C,iar enzimele vegetale - în domeniul de temperatură 45° şi 60°C.La temperaturi mai mari de 70°C majoritatea enzimelor se inactivează.Funcţia catalitică a enzimelor este anulată reversibil la temperaturi sub 0°C.

6.3.4.Influenţa pH-ului asupra activităţii enzimelor.Acţiunea tuturor enzimelor depinde de pH-ul mediului în care au loc reacţiile enzimatice.Fiecare enzimă manifestă o activitate maximă într-un diapazon determinat al concentraţiei ionilor de hidrogen,care se numeşte pH optim de acţiune.Valoarea pH-ului optim variază cu natura şi originea enzimei,natura chimică a substratului,sistemul tampon,prezenţa efectorilor etc.Pentru majoritatea enzimelor pH optim se situează în domeniul neutru sau slab acid.In mediul puternic acid sau puternic alcalin sînt active numai unele enzime. De exemplu,pH optim al pepsinei este 1,5-2,5 ,iar al arginazei 9,5-9,9.Scăderea activităţii enzimatice la un pH distanţat de pH optim se corelează cu denaturarea ireversibilă a moleculei de protein-enzimă.

Influenţa pH-ului asupra vitezei reacţiilor enzimatice se explică prin schimbarea stării de ionizare a enzimei,substratului şi complexului ES.Fiind proteine,enzimele se comportă ca amfoliţi şi la diferite valori ale pH-ului grupele funcţionale din centrul activ se pot afla în stare ionizată sau neionizată.In plus,pH mediului determinînd raportul grupelor cationice şi anionice în molecula de enzimă,influenţează structura ei terţiară care este esenţia-

lă pentru acţiunea catalitică.

6.3.5. Influenţa efectorilor asupra activităţii enzimelor. Activitatea enzimelor poate fi influenţată de o serie de substanţe chimice, denumite efectori. După acţiunea lor, efectorii se clasifică în : activatori şi inhibitori.

Activatorii influenţează pozitiv activitatea enzimei, pe care o intensifică sau stimulează. Intre activatorii enzimatici se numără numeroşi ioni metalici(Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+} etc.) şi unii anioni(Cl^- etc.). Activarea enzimelor de către cationii metalici este un fenomen complex. In unele cazuri, ionii metalici favorizează conformaţia catalitic activă a moleculei de enzimă, în altele - ei intră în constituţia centrului activ al aşa-numitelor metalo-enzime. Activatori ai enzimelor pot sluji de asemenea diferite substanţe organice. Combinaţiile conţinînd grupe -SH(cisteină, glutation redus etc.) exercită un rol protector al grupelor tiolice din situsul catalitic al enzimelor.

Substanţele care diminuează sau anulează activitatea enzimelor se numesc inhibitori(I). Inhibiţia enzimelor poate fi reversibilă şi ireversibilă. Ultima conduce la pierderea definitivă a activităţii enzimei, datorită denaturării ei prin legarea covalentă a inhibitorului cu un aminoacid esenţial pentru funcţia catalitică. Inhibitorul ireversibil formează cu enzima un complex EI nedisociabil. Ca inhibitori ireversibili se menţionează diizopropilfluorofosfatul(DIPF) pentru enzimele care conţin în centrul catalitic un rest de serină(acetilcolinesterază, chimotripsină, tripsină etc.), paracloromercuribenzoatul(PCMB), iodoacetamida(ICH_2CONH_2), Pb^{2+}, Hg^{2+} pentru enzimele cu un rest de cisteină în centrul activ şi alţii.

În cazul inhibiţiei reversibile se disting două tipuri principale : competitivă şi necompetitivă. Inhibitorii competitivi interacţionează cu centrul activ al enzimei. Ei prezintă o analogie structurală cu substratul şi în consecinţă concurează cu acesta pentru centrul activ al enzimei. Inhibitorii competitivi diminuează viteza de reacţie reducînd proporţia moleculelor de enzimă capabile să reacţioneze cu substratul. Inhibiţia competitivă poate fi anulată prin creşterea concentraţiei de substrat, care îndepărtează astfel inhibitorul de la centrul activ al enzimei. Acţiunea

terapeutică a majorităţii antibioticelor şi medicamentelor de sinteză se bazează pe inhibiţia competitivă a enzimelor produse de microorganismele patogene.

In inhibiţia necompetitivă inhibitorul se leagă cu enzima într-o altă zonă a moleculei,diferită de centrul activ.Inhibitorii necompetitivi pot reacţiona atît cu enzima liberă cît şi cu complexul ES.In acest caz liganzii S şi I pot fi legaţi simultan la olecula enzimei.

Importanţa teoretică şi practică a inhibitorilor este foarte are.Inhibitorii au o largă utilizare în studiul structurii enzimeor şi mecanismului reacţiilor biochimice.Apoi,inhibitorii se folosesc în terapeutica medicală,agricultură etc.

6.4.Specificitatea enzimelor

Faţă de catalizatorii chimici obişnuiţi,enzimele se deosebesc rin eficienţă catalitică şi înaltă specificitate.Fiecare enzimă cţionează catalitic numai asupra unui anumit substrat sau grup estrîns de substrate,care se transformă în produşi determinaţi cu n randament uimitor de mare.Specificitatea enzimelor este condiţi... e structurile unice ale situsurilor active,precum şi de complementaritatea structurală dintre situsul catalitic şi molecula de substrat,datorită cărora se asigură legarea eficientă a substratelor determinate şi se exclude fixarea nedorită a diferitelor combinaţii chimice,altele decît substratele.

Gradul de specificitate variază de la enzimă la enzimă.Multe enzime catalizează o singură reacţie de transformare a unui substrat determinat.Ele posedă o specificitate absolută.Acest tip de specificitate este întîlnit la enzimele: ureaza,arginaza etc.In unele cazuri enzimele pot să acţioneze asupra unei serii de substrate care au o structură chimică apropiată şi conţin legături chimice de acelaşi tip.Aceste enzime manifestă o specificitate absolută de grup.Ca exemple se menţionează enzimele:α-glucozidaza,β-glucozidaza,β-galactozidaza,enzimele proteolitice şi altele.Numeroase enzime „recunosc" numai tipul legăturii chimice(esterică,eterică,amidică) în molecula substratului şi sînt indiferente faţă de structura lui chimică.Aceasta este specificitatea relativă de grup.In calitate de exemple se consideră enzimele: lipazele şi esterazele.

Unele enzime se disting prin specificitate stereochimică, deci în raport cu modul de aranjare a atomilor în molecula substratului. In cazul substanţelor optic active, enzima are afinitate evidentă numai pentru unul din cei doi izomeri optici, rămînînd pasivă faţă de antipodul optic. Ca exemple dăm enzimele lactatdehidrogenaza, oxidaza D-aminoacizilor etc. Specificitatea geometrică se referă la capacitatea enzimelor de a acţiona asupra izomerilor cis-trans, transformînd preferenţial unul din aceşti izomeri. De exemplu, fumarathidrataza acţionează numai asupra acidului fumaric, avînd forma trans şi nu reacţionează cu acidul maleic - izomerul cis. Inalta specificitate a enzimelor garantează lipsa haosului chimic în celula vie.

6.5. Nomenclatura şi clasificarea enzimelor

După o propunere mai veche, enzimele se denumeau prin adăugarea sufixului ază la numele substratului corespunzător sau al tipului de reacţie catalizată. De exemplu, enzima care hidrolizează celuloza se numeşte celulază, enzima care oxidează (dehidrogenează) acidul succinic - succinatdehidrogenază. Continuă să se folosească de asemenea unele denumiri de lucru demult propuse: catalază, pepsină, tripsină etc. Comisia de enzimologie a Uniunii Internaţionale de Biochimie (IUB) a elaborat un nou sistem de nomenclatură şi clasificare a enzimelor. In acest sistem o enzimă este definită printr-o denumire şi printr-un cod de patru cifre. Prima cifră indică clasa la care aparţine enzima. Toate enzimele cunoscute în prezent (peste 1500) sînt grupate în şase clase, în funcţie de tipul general al reacţiilor pe care le catalizează (tabelul 6.2).

Tabelul 6.2. Clasele de enzime

Numărul clasei	Denumirea clasei	Caracterul acţiunii
1	Oxidoreductaze	Catalizează reacţiile de oxidoreducere.
2	Transferaze	Catalizează transferul diferitelor grupe şi radicali chimici de la o moleculă la alta.
3	Hidrolaze	Catalizează scindarea hidrolitică a diferitelor legături chimice în substrate.
4	Liaze	Catalizează reacţiile de adiţie sau

Tabelul 6.2(Continuare)

		de eliminare a unor grupe la legătura dublă în substrate.
5	Izomeraze	Catalizează modificarea geometrică sau spaţială a configuraţiei moleculelor de substrat.
6	Ligaze (Sintetaze)	Catalizează reacţiile de sinteză,folosind energia eliberată prin scindarea unei legături macroergice.

Fiecare clasă se subdivide în subclase şi subsubclase.Cea de a doua cifră din cod priveşte subclasa şi precizează natura grupelor chimice sau a legăturilor chimice din molecula substratului, supuse acţiunii enzimei.A treia cifră indică,de obicei,natura chimică a substratului,a acceptorului etc.In fine,a patra cifră arată numărul de ordine al enzimei în cadrul subsubclasei date.De regulă,înaintea codului enzimei se scriu literele EC(Enzyme Commission).De exemplu,glucokinaza are codul EC 2.7.1.2.In tabelul 6.3 se prezintă principalele subclase şi subsubclase de enzime.

6.6.Reglarea activităţii enzimatice.

Controlul metabolismului substanţelor în organismul viu se realizează în principal prin mecanismele care reglează localizarea, cantitatea şi activitatea catalitică a enzimelor.

6.6.1.Organizarea celulară a enzimelor.La bacterii spaţiul periplasmatic este izolat de citosol şi enzimele conţinute de acesta nu se amestecă cu alte enzime ale celulei.Unele enzime se află localizate în membrană sau sînt fixate pe suprafaţa ei.Celulele eucariotelor au mai multe compartimente: nucleul,mitocondriile,lizozomii,microcorpusculi ,vacuole,canalele citosolice şi veziculele reticulului endoplasmatic.Alături cu enzimele dizolvate în citosol,există enzime(catalizînd o serie de reacţii succesive) care sînt ataşate de membrane,formînd un sistem multienzimatic.Un exemplu de sistem de acest tip îl constituie ansamblul enzimelor descoperite în mitocondrii.Unele enzime se asociază şi funcţionează împreună,sub formă de complex unitar,macromolecular.Aceste proprietăţi se întîlnesc la dehidrogenazele α-cetoacizilor şi sinte-

Tabelul 6.3. Clasele, subclasele şi unele subsubclase de enzime

1. Oxidoreductaze

1.1. Acţionează asupra grupelor $>CH-OH$ a donorilor
- 1.1.1. Ca acceptor serveşte NAD^+ sau $NADP^+$

1.2. Acţionează asupra grupei aldehidice sau cetonice a donorilor
- 1.2.1. Ca acceptor serveşte NAD^+ sau $NADP^+$

1.3. Acţionează asupra grupelor $>CH-CH<$ a donorilor
- 1.3.1. Ca acceptor serveşte NAD^+ sau $NADP^+$

1.4. Acţionează asupra grupelor $>CH-NH_2$ a donorilor
- 1.4.1. Ca acceptor serveşte NAD^+ sau $NADP^+$
- 1.4.2. Ca acceptor serveşte oxigenul

1.5. Acţionează asupra grupelor $>CH-NH-$ a donorilor
- 15.1. Ca acceptor serveşte NAD^+ sau $NADP^+$

1.6. Acţionează asupra NADH sau NADPH ca donori
- 1.6.1. Ca acceptor serveşte NAD^+ sau $NADP^+$
- 1.6.2. Ca acceptor serveşte un citocrom
- 1.6.5. Ca acceptor serveşte o chinonă sau un compus înrudit

1.7. Acţionează asupra altor compuşi cu azot ca donori
- 1.7.2. Ca acceptor serveşte un citocrom
- 1.7.3. Ca acceptor serveşte oxigenul

1.8. Acţionează asupra unei grupe cu sulf a donorilor
- 1.8.1. Ca acceptor serveşte NAD^+ sau $NADP^+$
- 1.8.2. Ca acceptor serveşte un citocrom

1.9. Acţionează asupra grupărilor hem a donorilor
- 1.9.3. Ca acceptor serveşte oxigenul

1.10. Acţionează asupra difenolilor sau substanţelor înrudite ca donori

1.11. Acţionează asupra H_2O_2 ca acceptor

1.12. Acţionează asupra hidrogenului ca donor
- 1.12.1. Ca acceptor serveşte NAD^+ sau $NADP^+$
- 1.12.2. Ca acceptor serveşte un citocrom

1.13. Acţionează asupra unui donor cu încorporarea oxigenului molecular (oxigenaze)

1.14. Acţionează asupra unei perechi de donori cu încorporarea oxigenului molecular într-un donor (hidroxilaze)

Tabelul 6.3(Continuare)

1.15.Acţionează asupra radicalilor superoxid ca acceptor
1.16.Oxidează ioni metalici
1.17.Acţionează asupra grupei $-CH_2-$
2.Transferaze
2.1.Transferă grupe cu un carbon
2.1.1.Metiltransferaze
2.1.2.Transferazele grupelor hidroximetil,formil şi altele
2.1.3.Carboxil- şi carbamoil-transferaze
2.1.4.Amidinotransferaze
2.2.Transferă resturi de aldehide sau cetone
2.3.Aciltransferaze
2.4.Glicoziltransferaze
2.4.1.Hexoziltransferaze
2.4.2.Pentoziltransferaze
2.5.Transferă grupe alchil(altele decît grupele metil) sau aril
2.6.Transferă grupe cu azot
2.7.Transferă grupe conţinînd fosfor
2.8.Transferă grupe conţinînd sulf
3.Hidrolaze
3.1.Acţionează asupra legăturilor ester
3.1.1.Carboxil ester hidrolaze
3.1.2.Tiolester hidrolaze
3.1.3.Hidrolazele fosfomonoesterilor
3.2.Acţionează asupra compuşilor glicozil
3.3.Acţionează asupra legăturilor eterice
3.4.Acţionează asupra legăturilor peptidice(peptid-hidrolaze)
3.4.13.Dipeptid-hidrolaze
3.4.21.Proteinaze serinice
3.4.22.Proteinaze tiolice
3.4.23.Proteinaze acide
3.5.Acţionează asupra legăturilor C-N,altele decît legăturile peptidice
3.6.Acţionează asupra anhidridelor acide
3.7.Acţionează asupra legăturilor C-C
3.8.Acţionează asupra legăturilor cu halogen

Tabelul 6.3(Continuare)

3.9.Acţionează asupra legăturilor fosfor-azot
3.10.Acţionează asupra legăturilor sulf-azot
3.11.Acţionează asupra legăturilor carbon-fosfor
4.Liaze
4.1.Carbon-carbon liaze
4.1.1.Carboxi-liaze
4.1.2.Aldehid-liaze
4.2.Carbon-oxigen liaze
4.3.Carbon-azot liaze
4.4.Carbon-sulf liaze
4.5.Carbon-halogen liaze
4.6.Fosfor-oxigen liaze
4.99.Alte liaze
5.Izomeraze
5.1.Racemaze şi epimeraze
5.2.Cis-trans izomeraze
5.3.Oxidoreductaze intramoleculare
5.4.Transferaze intramoleculare
5.5.Liaze intramoleculare
5.99.Alte izomeraze
6.Ligaze(sintetaze)
6.1.Formează legături C-O
6.1.1.Ligaze formatoare de aminoacil-ARNt şi compuşi înrudiţi
6.2.Formează legături carbon-sulf
6.2.1.Acil-tiol ligaze
6.3.Formează legături C-N
6.3.1.Acid-amoniac(sau amin) ligaze(amid sintetaze)
6.3.2.Acid-aminoacid ligaze(peptid sintetaze)
6.3.5.C-N ligaze cu glutamina ca donor de grupă amido
6.4.Formează legături C-C
6.5.Formează legături esterice cu acidul fosforic

tazele acizilor graşi.Adsorbţia reversibilă a enzimelor pe structuri subcelulare sau asocierea reversibilă a enzimelor în sisteme multienzimatice biologic sînt avantajoase,întrucît micşorează distanţele parcurse de substrate pentru desfăşurarea reacţiilor succesive ale unei căi metabolice.

6.6.2.Controlul genetic al sintezei enzimelor.Izoenzime.Cantitatea enzimelor în celula vie este controlată de gene şi produşii lor.Mecanismele pe care se bazează reglarea sintezei enzimelor vor fi detaliate mai departe.Aici ne vom referi la izoenzime care reprezintă forme moleculare multiple ale enzimelor,a căror apariţie este corelată cu diferenţe genetic determinate în structura lor primară.Izoenzimele catalizează aceeaşi reacţie chimică, dar se deosebesc între ele printr-o serie de proprietăţi fizico-chimice(afinitatea faţă de substrat,viteza de reacţie etc.) şi imunologice.Izoenzimele se întîlnesc la aceeaşi specie.Ele sînt necesare organismului viu pentru reglarea metabolismului substanţelor,permiţîndu-i îndeplinirea unor funcţii care se schimbă în timp sau în dependenţă de condiţii.Astfel,concentraţia substratului poate varia de la ţesut la ţesut,în diferite compartimente celulare sau în fazele de dezvoltare a organismului.

Semnificaţia izoenzimelor este deosebită în multe domenii ale biologiei,medicinii şi agriculturii.Studiul izoenzimelor are largi aplicaţii în investigarea bazelor moleculare ale proceselor de morfogeneză,diferenţiere celulară şi evoluţie,de asemenea,de cancerogeneză şi alte stări patologice,precum şi în diagnosticarea biochimică clinică etc.

6.6.3.Reglarea activităţii enzimelor.Intr-o serie de cazuri activitatea enzimatică se schimbă în urma modificării covalente a moleculei de enzimă.Unele enzime care funcţionează în exteriorul celulei(în tractul digestiv sau în plasma sanguină) sînt sintetizate sub formă de precursori inactivi numiţi proenzime sau zimogene.Hidroliza unui număr limitat de legături peptidice în moleculele zimogenelor conduce la conversia lor în enzime active. Activarea zimogenelor este caracteristică pentru enzimele proteolitice digestive,enzimele implicate în coagularea sîngelui etc. Modificarea covalentă a unor enzime se poate realiza prin inserţia de grupări micromoleculare în moleculele lor.Aşa,de exemplu,

activitatea enzimelor care catalizează sinteza şi degradarea glicogenului este reglată prin fosforilarea unui anumit radical de serină din moleculele acestor enzime.

Un mecanism de reglare,mai răspîndit decît modificarea covalentă,este inhibiţia feedback,cînd acumularea produsului final al unei căi metabolice cauzează inactivarea enzimelor necesare pentru sinteza lui.Cel mai adesea este reprimată activitatea enzimei care catalizează prima etapă în procesul biosintetic dat(fig.6.6).In-

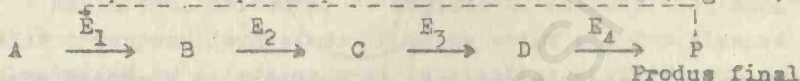


Fig.6.6.Inhibiţia feedback a primei enzime într-un proces metabolic prin legarea reversibilă a produsului final.

hibiţia enzimei E_1 nu mai permite funcţionarea succesivă a celorlalte enzime,deoarece substratele lor(B,C,D) nu se mai sintetizează.

Cel mai răspîndit mecanism de reglare a activităţii enzimelor în celula vie se consideră reglarea allosterică.La baza acestui fenomen stă legarea efectorilor sau modulatorilor cu situsul allosteric al enzimelor allosterice.Interacţiile dintre efector şi enzimele allosterice pot să conducă la diminuarea activităţii lor(inhibiţie allosterică) sau la stimularea activităţii lor(activare allosterică).După natura chimică a modulatorului efectele allosterice pot fi homotropice(însuşi substratul este efectorul allosteric) şi heterotropice(efectorul este reprezentat de alte substanţe decît substratul).Majoritatea enzimelor allosterice sînt proteine oligomere constituite din două sau mai multe subunităţi(protomeri) identice sau diferite,deci posedă mai multe situsuri allosterice şi catalitice per moleculă.Interacţia efectorului sau substratului cu enzima allosterică cauzează anumite modificări ale conformaţiei subunităţilor componente ceea ce influenţează activitatea catalitică a enzimei(fig.6.7).Prin legarea efectorului sau substratului la un situs allosteric are loc modificarea conformaţiei subunităţii vecine,determinînd activarea situsului catalitic al acestei subunităţi.Aceasta este un indiciu al cooperativităţii între situsurile enzimei allosterice.

Influenţa hormonilor asupra diferitelor procese enzimatice

va fi discutată mai departe.

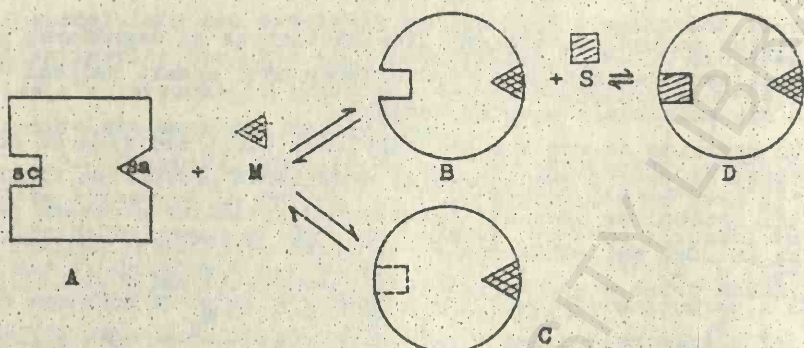


Fig.6.7.Modificarea conformaţiei în subunitatea monomeră a enzimei allosterice,indusă de legarea modulatorului(M) la centrul allosteric(sa).A - conformaţia subunităţii pînă la legarea modulatorului;B - modulatorul-activator induce o modificare conformaţională care favorizează fixarea substratului la situsul catalitic(sc);C - modulatorul-inhibitor induce o modificare conformaţională care influenţează negativ geometria situsului catalitic încît acesta devine inaccesibil pentru substrat;D - substratul şi activatorul sînt legate cu subunitatea avînd conformaţie activă.

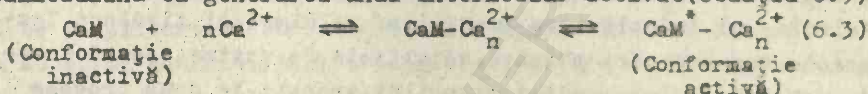
In anii '80 a fost descris şi un alt mecanism de reglare a activităţii enzimelor,în care este implicată calmodulina.Unele procese biologice sînt declanşate de creşterea tranzitorie a concentraţiei ionilor de Ca^{2+}.Intre aceste procese se numără degradarea glicogenului şi lipidelor,eliberarea mediatorilor chimici la nivelul nervilor,contracţia musculară,diviziunea celulară şi altele.

Toate celulele eucariote conţin o proteină receptoare a Ca^{2+} intracelular,denumită calmodulină(CaM),întrucît ea modulează efectele ionilor de Ca^{2+} asupra celulei.Se cunosc mai multe enzime care sînt direct afectate de calmodulină: fosfodiesteraza nucleotidelor ciclice,adenilatkinaza din creier,Ca^{2+}-ATP-aza membranei plasmatice,kinaza fosforilazei b,fosfolipaza A_2,NAD-kinaza vegetală care converteşte NAD^+ în $NADP^+$.

Calmodulina este o proteină acidă(pI=4,3)cu masa moleculară

de 16.790 D.Structura primară a calmodulinei de la diferite specii este foarte asemănătoare,indicînd un mare grad de conservare în filogenie.Calmodulina din creierul de bovine cuprinde 148 aminoacizi şi prezintă 4 situsuri pentru fixarea Ca^{2+}.Legarea Ca^{2+} induce ample modificări conformaţionale în molecula calmodulinei. Fiecare ion de Ca^{2+} care se fixează la calmodulină induce o anumită modificare conformaţională a ei şi probabil aceasta îi conferă calmodulinei capacitatea de a interacţiona cu aşa multe enzime.

Mecanismul molecular de acţiune al calmodulinei asupra enzimelor presupune două etape.In prima etapă are loc fixarea Ca^{2+} la calmodulină cu generarea unui intermediar activat(ecuaţia 6.3).



$$\underset{\text{(Conformaţie inactivă)}}{CaM} + nCa^{2+} \rightleftharpoons CaM\text{-}Ca_n^{2+} \rightleftharpoons \underset{\text{(Conformaţie activă)}}{CaM^* - Ca_n^{2+}} \qquad (6.3)$$

In etapa secundă,prin legarea conformaţiei active a calmodulinei la o enzimă specifică se produce activarea acesteia,proces în urma căruia enzima-ţintă dobîndeşte o nouă conformaţie(ecuaţia 6.4).



$$\underset{\text{(inactivă)}}{\text{Enzimă}} + CaM^* - Ca_n^{2+} \rightleftharpoons \underset{\text{Complex enzimă - calmodulină activ}}{\text{Enzimă}^* - CaM^* - Ca_n^{2+}} \qquad (6.4)$$

Pentru prima dată,influenţa reglatoare a CaM asupra enzimelor a fost studiată cu ajutorul fosfodiesterazei nucleotidelor ciclice dependentă de Ca^{2+}.Fosfodiesteraza există ca un dimer, fiecare din subunităţile lui fixînd o moleculă de calmodulină. Fosfodiesteraza nucleotidelor ciclice inactivează AMP ciclic hidrolizîndu-l la AMP.In ţesutulcerebral calmodulina stimulează atît adenilatciclaza cît şi fosfodiesteraza nucleotidelor ciclice.Această situaţie în care aceeaşi proteină produce stimularea enzimelor cu acţiune contrară pare cel puţin paradoxală,însă calmodulina manifestă afinităţi diferite pentru cele două enzime. Prin stimularea inegală a sintezei AMP ciclic şi hidrolizei lui, calmodulina poate menţine o concentraţie relativ constantă de AMP ciclic.Intrucît fosfodiesteraza are diferite valori ale K_M pentru AMP ciclic(K_M = 10^{-4} M) şi GMP ciclic(K_M = 2 x 10^{-5} M), cantităţile de AMP ciclic şi GMP ciclic se schimbă şi aceasta,de asemenea,poate fi importantă în reglarea metabolică.

7. METABOLISMUL SUBSTANTELOR - BAZA VIETII

Metabolismul constituie atributul esenţial,fundamental al materiei vii,indiferent de treapta de evoluţie pe care aceasta se află.In sens larg,prin metabolism se înţelege schimbul de substanţe şi energie,care are loc,în mod permanent,între organismul viu şi mediul înconjurător.Deci,metabolismul exprimă unitatea dialectică a organismului viu cu condiţiile existenţei lui.Metabolismul substanţelor se compune dintr-o multitudine de transformări chimice pe care le suportă în organismul viu,atît combinaţiile chimice din propria structură,care sînt supuse uzurii şi reînnoirii, cît şi substanţele nutritive luate din mediul înconjurător,care aduc materialul structural şi energetic pentru reconstrucţiile morfologice şi îndeplinirea funcţiilor celulare şi tisulare.Toate aceste transformări chimice,catalizate de enzime,poartă numele de metabolism intermediar şi pot fi grupate în două procese opuse: asimilaţia şi dezasimilaţia.Absorbţia,acumularea şi transformarea de către organismul viu a substanţelor din mediul înconjurător în componenţi chimici proprii sînt denumite prin asimilaţie(anabolism).Reacţiile anabolice au loc cu un consum de energie.Scindarea şi degradarea substanţelor chimice din organismul viu,inclusiv a celor introduse cu hrana,şi eliminarea produşilor rezultaţi reprezintă dezasimilaţia sau catabolismul.In catabolism rezultă energia necesară organismului viu.Anabolismul şi catabolismul se află într-o unitate deplină,într-o interdependenţă complexă şi nu poate fi separat unul de celălalt.Anabolismul şi catabolismul,ca două procese opuse,reprezintă contradicţia principală a materiei vii,contradicţie care stă la baza vieţii.Incetarea metabolismului înseamnă moartea organismului.In acest mod,metabolismul substanţelor,luat în ansamblul şi pluralitatea verigilor componente,constituie o confirmare persuasivă a principiului fundamental al dialecticii materialiste,după care orice fenomen reprezintă unitatea contrariilor.

Metabolismul substanţelor nu este posibil fără metabolismul energiei.Organismele fototrofe iau energia de la razele solare, iar organismele chemotrofe obţin energia din combinaţiile organice

conţinute în hrană.Fiecare substanţă organică din compoziţia materiei vii posedă o rezervă determinată de energie potenţială pe seama căreia poate fi efectuat un travaliu.Această energie se numeşte energie liberă.Nivelurile de energie liberă a substanţelor iniţiale şi a produşilor de reacţie sînt diferite.Ca urmare în procesele de transformare a substanţelor are loc o nouă repartizare a energiei libere între componentele sistemului de reacţie. Celulele organismelor vii dispun de mecanisme prin care energia liberă,provenită de la soare sau degajată în oxidarea anumitor substanţe,poate fi acumulată în combinaţii de un tip special,cunoscute sub denumirea de compuşi macroergici.Ei se disting printr-un înalt potenţial energetic,conţinînd o mare cantitate de energie ce se eliberează în reacţiile biochimice la care participă.S-a acceptat semnul ~ pentru a indica legătura a cărei hidroliză este asociată cu eliberarea unei cantităţi mari de energie liberă,egală cu aproximativ 25 kJ/mol şi mai mult.In sistemele biologice s-au descoperit cîteva clase de compuşi macroergici: derivaţi ai acidului fosforic,aciltioesteri,acilesterii carnitinei etc.In ansamblul compuşilor macroergici,sistemul adenilic,care include ATP,ADP şi AMP,ocupă un rol central în energetica celulei vii.ATP serveşte ca sursă nemijlocită de energie pentru majoritatea proceselor biologice endergonice,inclusiv contracţia musculară.In afară de ATP,pot fi donori de energie în procesele biosintetice de asemenea GTP,UTP şi CTP.

In celula vie sinteza şi degradarea diferitelor substanţe chimice se realizează cu ajutorul unei serii de reacţii enzimatice succesive care poartă numele de secvenţă sau cale metabolică,iar produşii ei intermediari se denumesc metaboliţi.In organismul viu căile metabolice se desfăşoară simultan şi sînt corelate între ele.Produsul sau produşii unei căi funcţionează ca substrat iniţial pentru altă cale metabolică.Pentru a se forma o anumită substanţă necesară celulei,calea metabolică trebuie să fie în esenţă ireversibilă,deci să aibă loc cu eliberarea unei cantităţi remarcabile de energie liberă.Deşi calea metabolică poate să cuprindă cîteva reacţii reversibile,desfăşurarea procesului numai într-o singură direcţie este determinată practic de

etapele ireversibile.In fiecare cale metabolică există un <u>stadiu de inițiere</u>,adică reacția de formare a primului metabolit,care nu are alt rol metabolic,decît acela de a sluji ca precursor intermediar în biosinteza produsului final al căii respective.In majoritatea cazurilor,reacția de demarare decurge cu o pierdere mare de energie liberă,încît reacția în esență este ireversibilă. De obicei căile metabolice se desfășoară cu viteze radical diferite,corespunzătoare acelui rol individual,pe care fiecare secvență de reacții îl joacă în viața celulei.Aceste viteze specifice sînt determinate de mecanismele de reglare sau control ale metabolismului substanțelor,asupra cărora vom insista mai departe.

8. METABOLISMUL GLUCIDELOR

8.1. ANABOLISMUL GLUCIDELOR

8.1.1. FOTOSINTEZA

Sursa primară de energie în biosferă o constituie lumina solară care este folosită de organismele vii pentru sinteza substanţelor organice din dioxid de carbon pe calea procesului de fotosinteză. Dintre organismele în care se desfăşoară acest proces fac parte unele genuri de bacterii fotosintetizante (bacteriile nesulfuroase purpurii - Rhodospirillum, Rhodopseudomonas; bacteriile sulfuroase purpurii - Chromatium, Thiospirillum; bacteriile sulfuroase verzi - Chlorobium; cianobacteriile sau algele albastre-verzi), algele eucariotice (diatomee, algele verzi, roşii şi negre) şi plantele superioare verzi. Fotosinteza furnizează acestor organisme toate substanţele organice necesare pentru creşterea şi dezvoltarea lor. In acelaşi timp aceste organisme sau produşii activităţii lor vitale servesc ca hrană pentru ceilalţi membri ai biosferei.

La toate organismele fotosintetizante, inclusiv plantele superioare, fotosinteza decurge în organite specializate conţinînd diferiţi pigmenţi fotoreceptori. La bacteriile fotosintetizante fotosinteza are loc în cromatofori, care conţin bacterioclorofilă (fig. 8.2), o cantitate mare de carotenoide şi fosfolipoproteine, precum şi enzimele implicate în acest proces. In algele albastre-verzi (cianofite) sînt prezenţi doi pigmenţi care nu se întîlnesc la alte procariote: clorofila a şi β-carotenul. La algele eucariotice şi la plantele superioare verzi fotosinteza se realizează în cloroplaste. Fiecare cloroplast are o membrană externă, conţinînd o cantitate mare de lipide şi un sistem complex de membrane interne (fig. 8.1). In stroma cloroplastului se găsesc nişte discuri alcătuite dintr-o pereche de membrane dispuse la o distanţă de 9 nm, asemănătoare cu un săculeţ închis, numite tilacoide. Un fişic (stivă) din aceste discuri condensate reprezintă o grană. Diferite grane sînt conectate prin regiuni membranoase numite lamelele stromei. Membranele tilacoidelor se compun dintr-un strat exterior de proteine şi un strat interior lipidic, conţinînd clorofilă, carotenoide, galactozildiacilgliceroli, digalactozildiacilgliceroli,

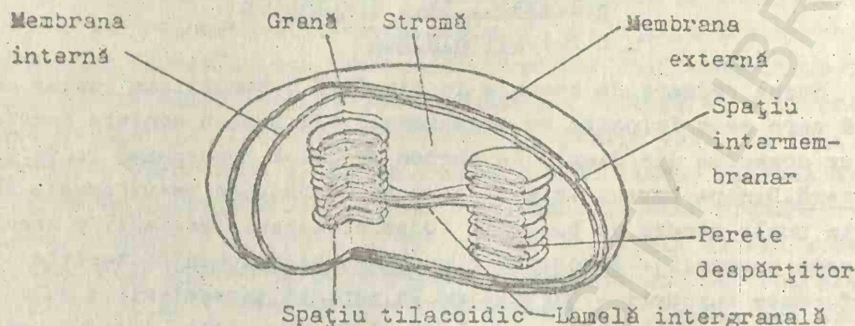


Fig.8.1.Schema ultrastructurii unui cloroplast.

sulfochinovozildiacilgliceroli şi glicerofosfatide.Tilacoidele reprezintă aparatul de conversie a energiei luminoase.In partea solubilă a cloroplastului se găsesc enzimele care transformă CO_2 în glucide.Cloroplastele conţin ribozomi care participă activ în sinteza proteinelor şi un ADN care este distinct de ADN nuclear.Deci cloroplastele sînt organite cu o autonomie considerabilă.

8.1.1.1.Pigmenţi fotoreceptori.Dintre toţi pigmenţii cloroplastelor,clorofilele joacă rolul esenţial în procesul de fotosinteză.Clorofilele sînt magneziu-porfirine,în care ciclul pirolic IV este parţial redus şi care conţin un izociclu V,fuzionat la ciclul pirolic III(fig.8.2).Atomul neionizat de Mg se fixează prin două covalenţe(—) şi două legături coordinative(→) cu cei 4 atomi de N ai ciclurilor pirolice.Grupa laterală carboxil de la ciclul V este esterificată cu metanol,iar cea de la ciclul IV cu fitol sau se găseşte liberă.După natura substituenţilor laterali se deosebesc mai multe clorofile: a,b,c,d,bacterioclorofile.In cloroplaste şi cromatofori,clorofilele se găsesc asociate predominant cu proteinele,formînd cromoproteinele numite cloroplastine.

Fotoreceptorul principal în cloroplastele plantelor verzi este clorofila a,al cărui conţinut depăşeşte de 3 ori pe cel al clorofilei b.La diatomee,algele brune şi dinoflagelate a fost descoperită clorofila c.In algele roşii este prezentă clorofila d. Bacteriile fotosintetizante conţin bacterioclorofile.Iradierea cloroplastelor produce o fluorescenţă uşor măsurabilă a clorofilei a,în timp ce pentru celelalte forme de clorofilă,de asemenea, carotenoide şi alţi pigmenţi,nu se observă acest fenomen.De aici

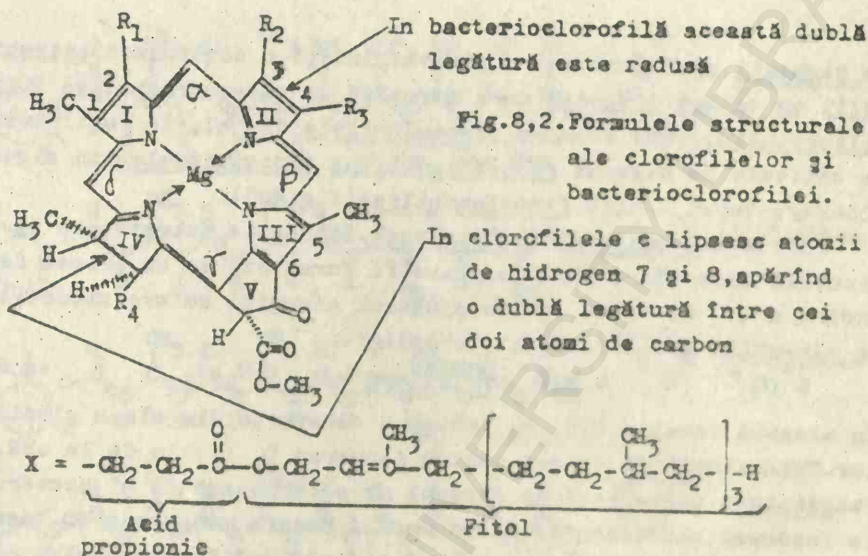


Fig.8,2. Formulele structurale ale clorofilelor şi bacterioclorofilei.

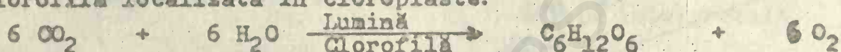
Tipul de clorofilă	R_1	R_2	R_3	R_4
a	$-CH=CH_2$	$-CH_3$	$-CH_2-CH_3$	X
b	$-CH=CH_2$	$-CH=O$	$-CH_2-CH_3$	X
c_1	$-CH=CH_2$	$-CH_3$	$-CH_2-CH_3$	$-CH=CH-COOH$
c_2	$-CH=CH_2$	$-CH_3$	$-CH=CH_2$	$-CH=CH-COOH$
d	$-CH=O$	$-CH_3$	$-CH_2-CH_3$	X
bacterio-clorofila a	$-C(=O)-CH_3$	$-CH_3$	$-CH_2-CH_3$	X

se poate deduce că toate aceste substanţe servesc ca pigmenţi auxiliari care absorb energia luminoasă şi o transmit eficient clorofilei a.

Pe lîngă clorofilele b, c şi d, între pigmenţii auxiliari cei mai importanţi se numără carotenii (fig.8.3), dintre care principalul derivat în majoritatea plantelor este β-carotenul. Bacteriile sulfuroase verzi conţin γ-caroten. In cloroplastele plantelor verzi şi algelor verzi se întîlnesc diferite carotenoide oxigenate, între care predomină: <u>luteina</u>, <u>violaxantina</u> şi <u>neoxantina</u>. Altă clasă

de pigmenţi auxiliari,mai puţin răspîndiţi,o alcătuiesc tetrapirolii cu catenă deschisă care formează gruparea prostetică a ficobiliproteinelor.De exemplu,ficoeritrinele din algele roşii conţin în calitate de pigment ficoeritrobilina,ficocianinele din algele albastre-verzi conţin ficocianobilina(fig.8.3).

8.1.1.2.Mecanismul fotosintezei.Schematic fotosinteza în plantele superioare şi alge poate fi formulată ca un proces de reducere a CO_2 de către H_2O,cu ajutorul energiei solare absorbită de clorofila localizată în cloroplaste:



$$6\ CO_2 + 6\ H_2O \xrightarrow[\text{Clorofilă}]{\text{Lumină}} C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2$$

In această ecuaţie,$C_6H_{12}O_6$ indică o substanţă din clasa glucidelor.Toţi atomii de oxigen pentru formarea O_2 provin de la apă.In fotosinteza bacteriană în general nu se formează O_2 şi bacteriile folosesc alt donor de hidrogen H_2A pentru reducerea CO_2.Acest donor de hidrogen poate fi H_2,H_2S,tiosulfatul,izopropanolul,acid carboxilic etc.

Mecanismul fotosintezei,prin care energia electromagnetică se transformă în energia legăturilor chimice ale substanţelor sintetizate,este complex şi cuprinde două faze: a)reacţii fotochimice,în care apa este scindată de către lumină,cu generarea ATP şi NADPH şi b)reacţii la întuneric,în urma cărora CO_2 este redus la glucide cu ajutorul energiei inclusă în ATP şi NADPH.

8.1.1.2.1.Reacţii fotochimice.Plantele superioare au reuşit să atingă un stadiu mai înalt de evoluţie,întrucît au dobîndit independenţa de sursele exterioare de reducători chimici,datorită procesului fotochimic în cursul căruia apa se oxidează,rezultînd ATP şi NADPH.Mecanismul de conversie a energiei luminoase în energia chimică acumulată în ATP şi echivalentul reducător sub forma NADPH,se numeşte fosforilare fotosintetică sau fotofosforilare(D.Arnon 1954,1958).Numeroase cercetări au dovedit că în cloroplaste există două fotosisteme diferite care participă la fotofosforilare(fig.8.4).Unul din ele,numit fotosistemul I este activat de lumina din domeniul roşu îndepărtat(~700nm) şi generează un reducător puternic care conduce la formarea NADPH.Fotosistemul II necesită lumina roşie(λ<680nm) cu o energie mai mare şi produce un oxidant puternic care determină eliberarea O_2 din H_2O.In acelaşi timp,fotosistemul I dă naştere unui oxidant slab,iar foto-

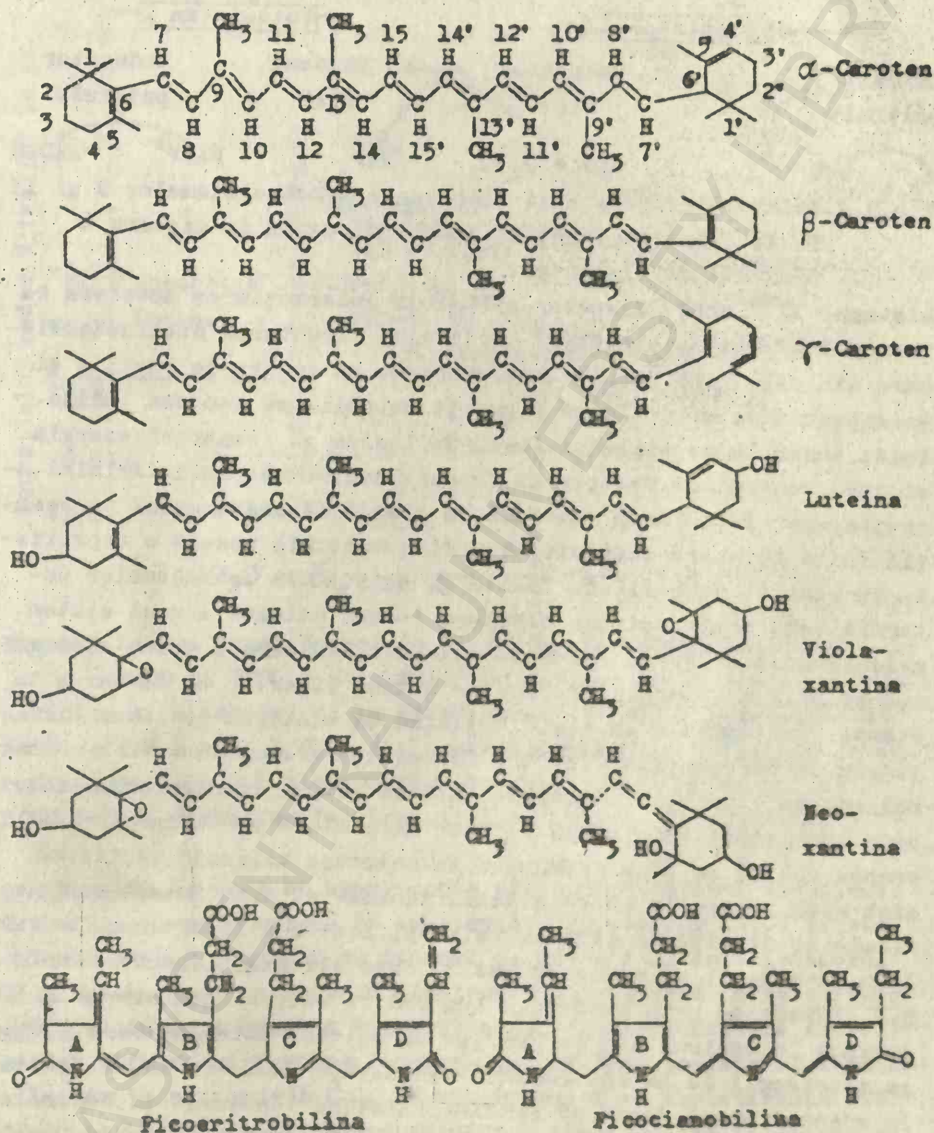


Fig.8.3.Structura unor pigmenţi auxiliari,diferiţi de clorofile,prezenţi în organismele fotosintetizante.

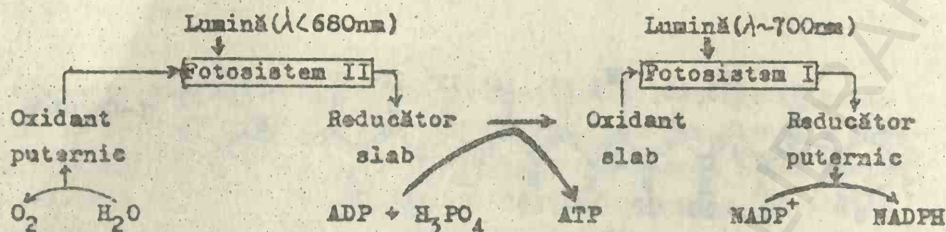


Fig.8.4.Modelul interacţiunii cooperante a fotosistemelor I şi II în fotosinteză.Săgeţile indică direcţia de mişcare a fluxului de electroni.

sistemul II - unui reducător slab.Prin interacţiunea acestora se formează ATP.Fotosistemele I şi II sînt structural distincte.Fiecare din cele două fotosisteme cuprinde un <u>centru de reacţie</u> şi un ansamblu de molecule de pigmenţi capabili să capteze lumina. Acest ansamblu de pigmenţi absoarbe lumina şi transferă energia ei spre centrul de reacţie al fotosistemului respectiv.Primind această energie,o formă specială de clorofilă din centrul de reacţie trece în stare excitată.Clorofila excitată posedă o capacitate de reacţie deosebit de înaltă şi constituie un reducător puternic care poate ceda un electron formei oxidate a unui sistem oxido-reducător.Forma specială de clorofilă care a cedat electronul se află în stare de radical - cation liber.Ea se întoarce în starea fundamentală iniţială,obţinînd un electron de la un alt sistem oxido-reducător.Fiecare fotosistem are acceptorul şi donorul său de electroni.Concepţia actuală asupra fotofosforilării este schematizată în fig.8.5.Toate moleculele participante la proces fie că se află integrate în membrana tilacoidică,fie că sînt slab legate cu aceasta.Numai adenin- şi nicotinamid-nucleotidele se dizolvă în limhidul stromei,posedînd libertatea de a se lega reversibil cu acele enzime cu care ele reacţionează.Din fig. 8.5 se vede că prin absorbţia luminii de către fotosistemul II se produce în centrul său de reacţie un oxidant puternic care extrage electronii de la apă,formînd astfel O_2: $2H_2O \longrightarrow 4H^+ + O_2 + 4e^-$. In această etapă joacă un rol important Mn^{2+},prezent în centrul de reacţie al fotosistemului II.Electronii eliberaţi din molecula de apă sînt captaţi de clorofila a din centrul de reacţie <u>P 680</u> şi transmişi prin intermediul unui reducător slab Q către <u>citocro-</u>

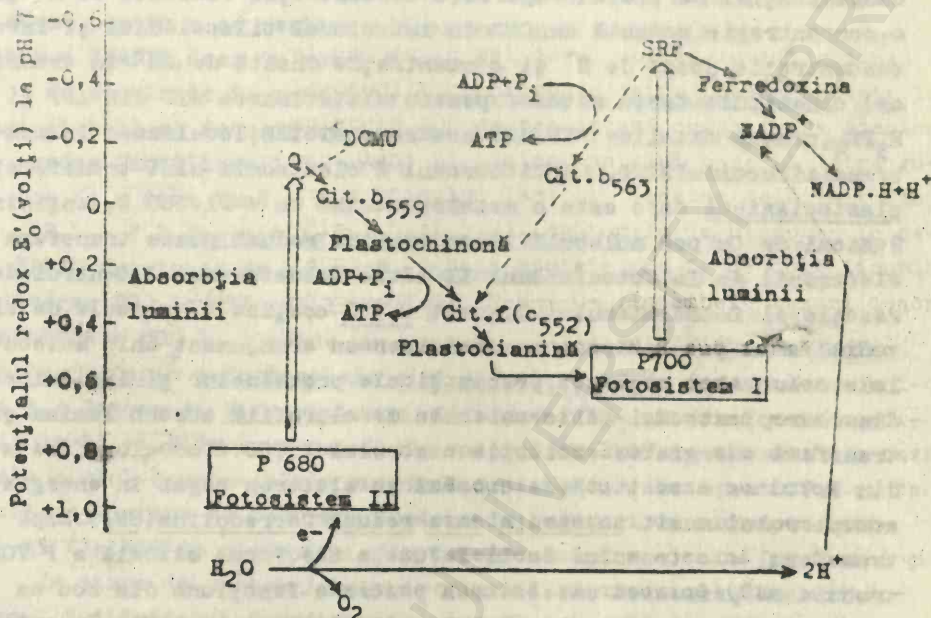
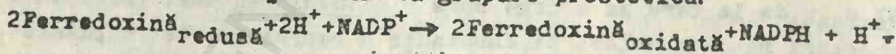


Fig.8.5.Schema transferului de electroni în fotofosforilare.

P680 şi P700 - clorofila din centrul de reacţie;Q - primul acceptor de electroni de la fotosistemul II;SRF - substanţa care reduce ferredoxina;DCMU - diclorofenildimetilureea;săgeţile întrerupte indică drumul electronilor în fotofosforilarea ciclică. DCMU: 3-(3,4-diclorfenil)-1,1-dimetilureea (Cl-⟨C₆H₃Cl⟩-NH-C(=O)-N(CH₃)-CH₃)

<u>mul b_{559}</u>,de la care se scurge spre <u>plastochinonă</u>(vezi Coenzime). Cercetări recente relevă că substanţa Q reprezintă tot o plastochinonă legată puternic cu centrul de reacţie al fotosistemului II.Plastochinona transportă electronii mai departe către <u>citocromul f</u>(simbolul f provine din latinescul frons=frunză) de tip c. Astfel citocromul f trece în stare redusă.Prin transferul electronilor de la citocromul b_{559} la citocromul f se sintetizează ATP. Cînd plastochinona se reduce primind 2 electroni de la citocromul b_{559},se extrag $2H^+$ din mediul apos(matrixul) cloroplastului,deci din partea exterioară a tilacoidului.La reducerea citocromului f de către plastochinona redusă se eliberează $2H^+$ care pătrund prin membrana tilacoidului în interiorul lui.Se consideră că gradientul

concentraţiei de protoni apărut(o concentraţie ridicată de H^+ şi o concentraţie scăzută de OH^- în interiorul tilacoidului şi invers, concentraţie joasă de H^+ şi concentraţie înaltă de OH^- în exterior) constituie forţa motrice pentru sintetizarea ATP din ADP şi H_3PO_4,proces catalizat de ATP-aza reversibilă,localizată în membrana tilacoidului.De la citocromul f electronii sînt transferaţi plastocianinei care este o metaloproteină cu M=21.000 D,conţinînd 2 atomi de Cu per moleculă.Plastocianina redusă poate transfera electronii de la fotosistemul II către fotosistemul I.Centrul de reacţie al fotosistemului I,numit P 700 conţine o moleculă de clorofilă a în jurul căreia se află într-un aranjament unic moleculele celorlalţi pigmenţi,precum şi ale proteinelor şi lipidelor din cloroplaste.Mai multe molecule de clorofilă absorb lumina şi transferă energia de excitaţie centrului P 700.Cînd clorofila a din P 700 este excitată,ea cedează un electron bogat în energie acceptorului numit substanţa care reduce ferredoxina(SRF).După transferul electronului de la P 700 la SRF,forma oxidată a P 700 trebuie să primească un electron pentru a funcţiona din nou ca centru de reacţie.Fotosistemul I primeşte aceşti electroni prin intermediul plastocianinei de la fotosistemul II.Forma redusă a SRF transferă electronul său feredoxinei,care este o feroproteină, conţinînd Fe neheminic şi atomi de sulf în moleculă.Atomul de Fe din centrul activ al ferredoxinei se oxidează şi se reduce alternativ.Ferredoxina redusă transferă electronul către $NADP^+$ pentru a forma NADPH.Această reacţie este catalizată de ferredoxin-NADP reductază care conţine FAD ca grupare prostetică:



$$2Ferredoxină_{redusă} + 2H^+ + NADP^+ \rightarrow 2Ferredoxină_{oxidată} + NADPH + H^+$$

După Arnon şi colab.(1965) o cantitate suplimentară de ATP poate să se formeze în cloroplaste pe calea fotofosforilării ciclice.Electronul cu potenţialul înalt de la SRF sau ferredoxina redusă se întoarce la forma oxidată a P 700 pe un drum ciclic,indicat în fig.8.5 prin săgeţi întrerupte.In acest proces intervine citocromul b_{563}(citocromul b_6).Fotofosforilarea ciclică este operativă cînd $NADP^+$ se găseşte în cantitate insuficientă pentru a accepta electronii de la SRF sau ferredoxina redusă.Bacteriile fotosintetizante conţin numai sistemul I.

In privinţa randamentului cuantic al reacţiei fotochimice,se

consideră necesare cîte 4 cuante în fiecare din cele două fotosisteme pentru a se realiza eliberarea unei molecule de O_2 cu formarea a 2NADPH, deci în total 8 cuante.

In concluzie, în reacţiile fotochimice se formează primii produşi stabili ai fotosintezei, anume ATP, NADPH şi O_2. Oxigenul este un produs inutilizabil de către plantă. ATP şi NADPH se folosesc în cea de a doua fază a fotosintezei.

8.1.1.2.2. Reacţii la întuneric. In reacţiile la întuneric ATP şi NADPH, furnizate de reacţiile fotochimice, se folosesc pentru reducerea CO_2 în glucide, lipide şi proteine. Transformarea fotosintetică a CO_2 în glucide este cunoscută sub denumirea de ciclul pentozofosforic reducător sau ciclul Benson-Calvin, după numele lui A.A.Benson şi M.Calvin, care utilizînd $^{14}CO_2$ radioactiv au contribuit la elucidarea acestei căi metabolice. Conform datelor actuale ciclul Benson-Calvin suprinde patru etape: 1) etapa de carboxilare; 2) etapa de reducere; 3) etapa de regenerare a acceptorului CO_2 şi 4) etapa de sinteză a matèrialului celular.

In etapa de carboxilare, molecula CO_2 se condensează cu ribulozo-1,5-difosfatul formînd un compus de tranziţie cu 6C care se hidroxilează repede în două molecule de acid D-3-fosfogliceric (fig.8.6). Reacţia A este catalizată de ribulozo-1,5-difosfatcarboxilază, enzimă prezentă în cloroplaste pe suprafaţa membranelor tilacoidice.

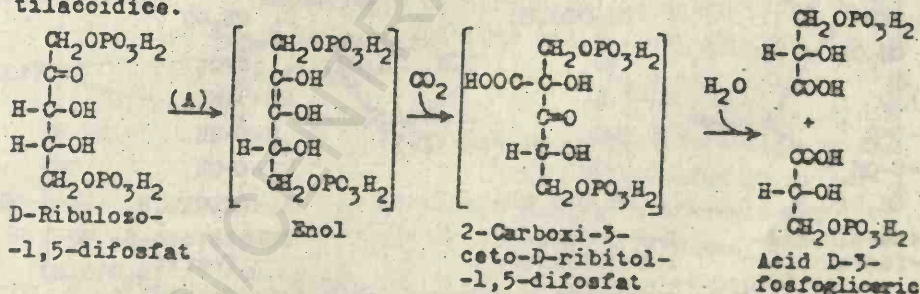


Fig.8.6. Carboxilarea ribulozo-1,5-difosfatului.

Etapa de reducere a ciclului Benson-Calvin se realizează sub acţiunea a două enzime: fosfogliceratkinaza (B) şi gliceraldehidfosfatdehidrogenaza (C). In această etapă acidul 3-fosfogliceric se reduce în gliceraldehid-3-fosfat, cu participarea ATP şi NADPH (fig. 8.7). Reacţiile catalizate de enzimele (B) şi (C) reprezintă inver-

sarea a două etape din glicoliză, unde intervine însă coenzima NAD. Enzima (B) este repartizată între cloroplaste şi citoplasmă, iar enzima (C) este localizată în cloroplaste.

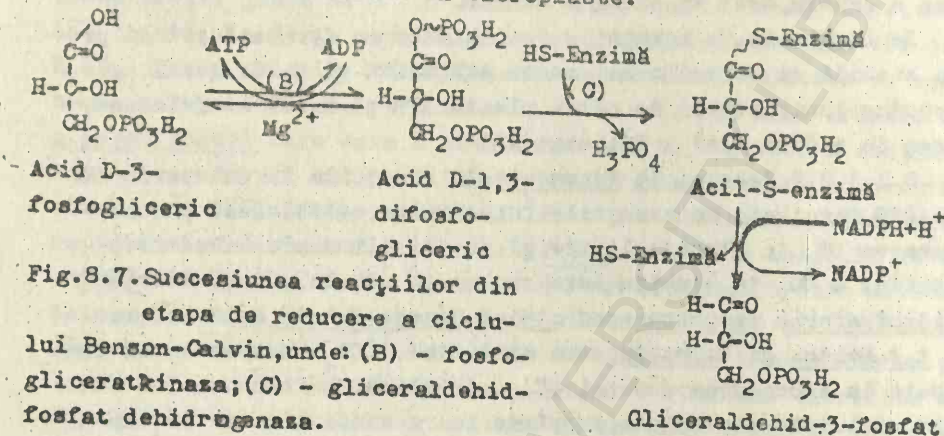


Fig.8.7. Succesiunea reacţiilor din etapa de reducere a ciclului Benson-Calvin, unde: (B) - fosfogliceratkinaza; (C) - gliceraldehidfosfat dehidrogenaza.

In etapele a treia şi a patra ale ciclului Benson-Calvin, gliceraldehid-3-fosfatul, format în etapa de reducere, se transformă parţial în ribulozo-1,5-difosfat, acceptorul CO_2, iar parţial în fructozo-6-fosfat şi alţi compuşi. Conversia gliceraldehid-3-fosfatului în fructozo-6-fosfat (fig.8.8) decurge prin inversarea reacţiilor corespunzătoare din glicoliză.

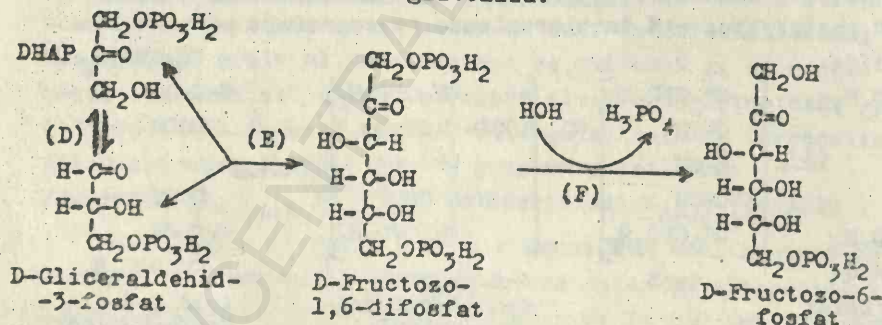


Fig.8.8. Reacţiile de conversie a gliceraldehid-3-fosfatului în fructozo-6-fosfat în cloroplaste. DHAP - dihidroxiacetonfosfat; (D) - triozofosfatizomeraza; (E) - aldolaza; (F) - hexozodifosfataza.

Desfăşurarea ulterioară a ciclului Benson-Calvin presupune resinteza ribulozo-1,5-difosfatului care este necesar pentru fixarea CO_2. Reacţiile care duc la regenerarea ribulozo-1,5-difos-

-fatului, într-o mare măsură sînt analoage cu reacţiile din ciclul pentozofosforic oxidativ(vezi mai departe). Problema constă în sinteza unei glucide cu 5C din două glucide cu 6C şi respectiv 3C. Această sinteză se realizează prin următoarea succesiune de reacţii(fig.8.9).

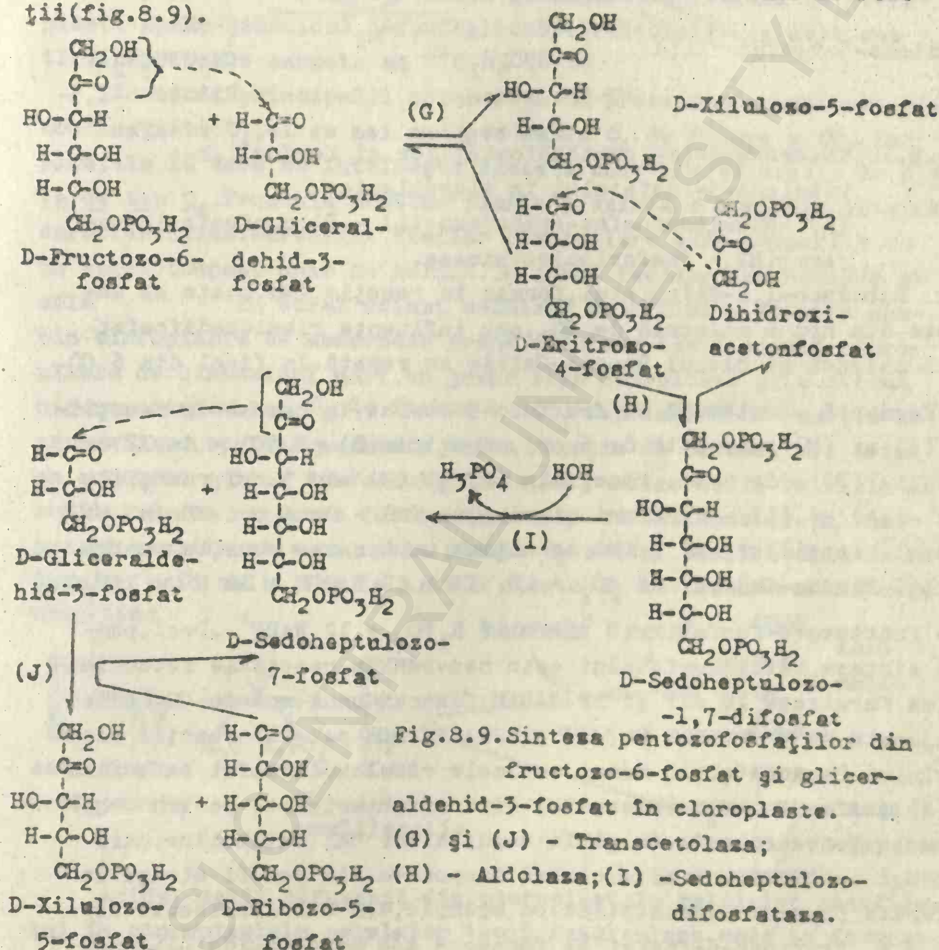


Fig.8.9. Sinteza pentozofosfaţilor din fructozo-6-fosfat şi gliceraldehid-3-fosfat în cloroplaste.
(G) şi (J) - Transcetolaza;
(H) - Aldolaza; (I) -Sedoheptulozodifosfataza.

In continuare, pentozofosfaţii formaţi în reacţiile (G) şi (J) se transformă în ribulozo-5-fosfat(fig.8.10). Enzima ribulozofosfat-3-epimeraza converteşte xilulozo-5-fosfatul în ribulozo-5-fosfat. Transformarea ribozo-5-fosfatului în ribulozo-5-fosfat este catalizată de ribozofosfat-izomerază. Ciclul reacţiilor fotosinte-

tice la întuneric se încheie cu fosforilarea ribulozo-5-fosfatului la ribulozo-1,5-difosfat, sub acţiunea fosforibulozokinazei (fig.8.10).

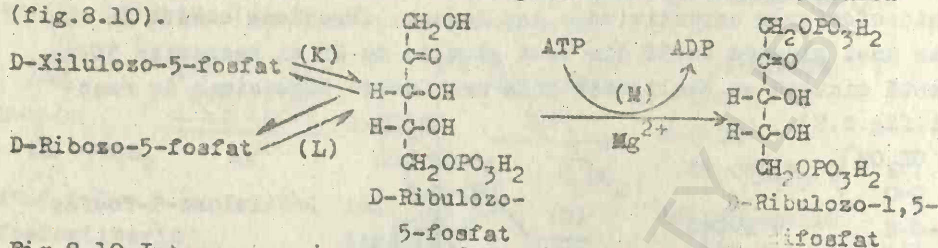


Fig.8.10. Interconversia pentozofosfaţilor şi fosforilarea ribulozo-5-fosfatului în cloroplaste. (K) - Ribulozofosfat-epimeraza; (L) - Ribozofosfatizomeraza; (M) - Fosforibulozokinaza.

Ribulozo-1,5-difosfatul, format în reacţia (M), poate să accepte din nou o moleculă de CO_2, sub influenţa ribulozodifosfat carboxilazei şi ciclul Benson-Calvin se repetă. In final din 6 CO_2 se formează o moleculă de fructozo-6-fosfat, în care scop reacţiile (A) şi (M) se repetă de 6 ori, reacţiile (B) şi (C) - de 12 ori, reacţia (D) - de 5 ori, reacţiile (E) şi (F) - de 3 ori, reacţiile (G) - (J) şi (L) - de 2 ori şi reacţia (K) - de 4 ori. Făcînd bilanţul reacţiilor (A) - (M) se obţine următoarea ecuaţie pentru ciclul Benson-Calvin : $6\ CO_2 + 18\ ATP + 12\ NADPH + 12\ H^+ + 11H_2O \longrightarrow$ Fructozo-6-fosfat $+ 18\ ADP + 17\ H_3PO_4 + 12\ NADP^+$. Deci, pentru sinteza hexozofosfatului este necesar ca reacţiile fotochimice să furnizeze 18 ATP şi 12 NADPH; fixarea unui mol de CO_2 este conjugată cu un consum de 3ATP şi 2NADPH. Din cele 13 reacţii ale ciclului Benson-Calvin numai enzimele ribulozodifosfat carboxilaza(A) şi fosforibulozokinaza(M) sînt caracteristice pentru organismele fotoautotrofe. Ca şi în cazul altor căi metabolice, unii produşi intermediari ai ciclului Benson-Calvin pot fi atraşi în diferite procese biosintetice. De exemplu, din dihidroxiacetonfosfat via fructozo-6-fosfat se formează alte monoglucide, oligoglucide, poliglucide etc.

8.1.1.3. Alte reacţii de fixare a CO_2 la plante. Experienţele cu $^{14}CO_2$ au demonstrat că în fotosinteză alături cu glucidele se sintetizează acizi organici, aminoacizi, proteine, lipide şi alte

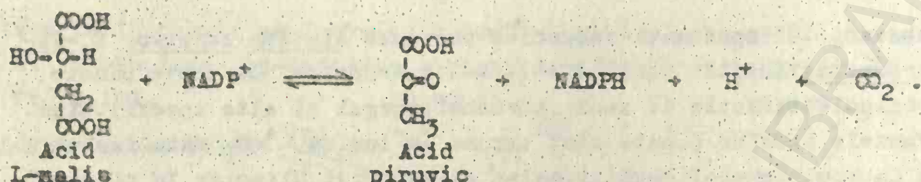
substanţe. O importanţă deosebită prezintă sinteza acizilor C_4-dicarboxilici (acizii oxalilacetic, malic, aspartic) la unele plante tropicale (trestia de zahăr, porumbul, sorgul şi alte specii). Cînd frunzele acestor plante sînt expuse la lumină, $^{14}CO_2$ este inclus la început în oxalilacetat, malat şi aspartat. Ulterior în cloroplaste apare şi acidul 3-fosfogliceric radioactiv şi mult mai tîrziu hexozele marcate cu ^{14}C.

Intrucît principalii metaboliţi ai procesului menţionat sînt combinaţiile C_4, el se mai numeşte calea C_4 de fixare a CO_2, iar plantele la care se întîlneşte această cale poartă numele de plante de tip C_4. Frunzele acestor plante prezintă o anatomie internă caracteristică. Nervurile tecilor fasciculare sînt acoperite cu un strat compact unic de celule. In jurul tecilor fasciculare se află în strat afînat celulele mezofilului. Acestea conţin cloroplaste cu numeroase grane. Celulele tecii posedă cloroplaste de dimensiuni mari, cu grane slab dezvoltate şi o stromă hipertrofică. Calea C_4 de fixare a CO_2 cuprinde două reacţii de carboxilare, spaţial separate. Prima reacţie de carboxilare, avînd ca substrat acidul fosfoenolpiruvic, se realizează în celulele mezofilului, sub acţiunea fosfoenolpiruvat carboxilazei, rezultînd acidul oxalilacetic. La unele plante-C_4 acidul oxalilacetic se reduce în acid malic, iar la alte plante-C_4 se transformă în acid aspartic:

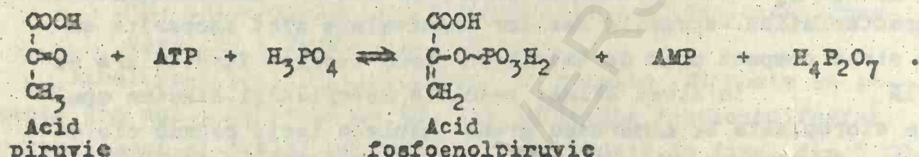
$$\underset{\text{Acid fosfoenolpiruvic}}{\begin{matrix}COOH\\ |\\ C\text{-}O\sim PO_3H_2\\ \|\\ CH_2\end{matrix}} \xrightarrow[H_2O \;\; H_3PO_4]{CO_2} \underset{\text{Acid oxalilacetic}}{\begin{matrix}COOH\\ |\\ C{=}O\\ |\\ CH_2\\ |\\ COOH\end{matrix}} \xrightarrow{NADPH+H^+ \;\; NADP^+} \underset{\text{Acid L-malic}}{\begin{matrix}COOH\\ |\\ HO\text{-}C\text{-}H\\ |\\ CH_2\\ |\\ COOH\end{matrix}}$$

$$\underset{\text{Acid oxalilacetic}}{\begin{matrix}COOH\\ |\\ C{=}O\\ |\\ CH_2\\ |\\ COOH\end{matrix}} \longrightarrow \underset{\text{Acid L-aspartic}}{\begin{matrix}COOH\\ |\\ H_2N\text{-}C\text{-}H\\ |\\ CH_2\\ |\\ COOH\end{matrix}}$$

Acidul malic difuzează din cloroplastele celulelor mezofilului în cloroplastele celulelor tecii fasciculare, unde se decarboxilează cu formarea CO_2 şi acidului piruvic, reacţia fiind catalizată de malatdehidrogenaza NADP-dependentă. CO_2 eliberat în această reacţie serveşte ca substrat în cea de a doua reacţie de carboxilare, menţionată mai sus, care este catalizată de ribulozodifosfat carboxilază. In urma acestei reacţii, desfăşurată în celulele



tecii fasciculare, CO_2 este inclus în acidul 3-fosfogliceric, care apoi se transformă în fructozo-6-fosfat prin intermediul ciclului Benson-Calvin. Acidul piruvic, format în reacţia de mai sus, trece din cloroplastele celulelor tecii fasciculare în cloroplastele celulelor mezofilului, unde se transformă în acid fosfoenolpiruvic, datorită piruvat-ortofosfat-dikinazei:



Moleculele de fosfoenolpiruvat difuzează din cloroplaste în citoplasma celulelor mezofilului unde folosesc drept substrat pentru fosfoenolpiruvat carboxilază.

Acidul aspartic format în unele plante-C_4 migrează din citoplasma celulelor mezofilului în mitocondriile celulelor tecii fasciculare, unde este supus transaminării conducînd la acidul oxalilacetic. Ultimul este redus la acid malic, care prin decarboxilare dă CO_2 şi acid piruvic. CO_2 difuzează din mitocondrii în cloroplaste unde participă la ciclul Benson-Calvin. Acidul piruvic trece în cloroplastele mezofilului unde este convertit la acid fosfoenolpiruvic. Acesta leagă următoarea moleculă de CO_2 şi ciclul se repetă.

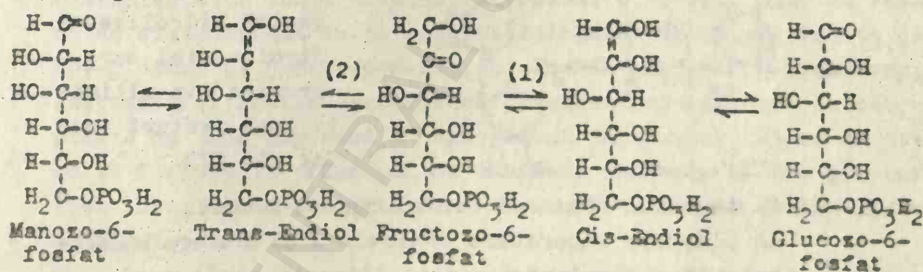
Acest mecanism constituie, probabil o adaptare a plantelor-C_4 la condiţiile climatice nefavorabile de la tropice, permiţînd o creştere a intensităţii fotosintezei de 2 ori, în comparaţie cu plantele-C_3 (care asimilează CO_2 prin ciclul Benson-Calvin).

8.1.1.4. Reglarea fotosintezei. Dintre aspectele privind reglarea fotosintezei se vor discuta aici unele din cele bazate pe proprietăţile enzimelor implicate în proces. Reacţia cheie a ciclului Benson-Calvin este carboxilarea ribulozo-1,5-difosfatului. Activitatea ribulozodifosfat carboxilazei este reglată de sub-

stratul său care se comportă ca un efector negativ la concentrații mari, în timp ce NADPH acționează ca un efector puternic pozitiv. Ribulozodifosfat carboxilaza este activată allosteric de fructozo-6-fosfat și inhibată de fructozo-1,6-difosfat. In acest mod, acumularea fructozo-1,6-difosfatului servește ca semnal de stopare a reacției de carboxilare, în timp ce formarea fructozo-6-fosfatului în concentrații ridicate inițiază reacțiile la întuneric. De aici rezultă că funcționarea ciclului Benson-Calvin depinde în mod hotărîtor de fructozodifosfatază. In cloroplaste această enzimă este activată de lumină, prin intermediul ferredoxinei reduse și a unui „factor proteic". Lumina activează și alte enzime ale ciclului Benson-Calvin, de exemplu gliceraldehidfosfat dehidrogenaza.

8.1.2. Biosinteza monoglucidelor

Fructozo-6-fosfatul format în fotosinteză constituie precursorul pentru biosinteza diferitelor monoglucide. In plante și animale se întîlnesc enzime specifice care transformă fructozo-6-fosfatul în glucozo-6-fosfat, manozo-6-fosfat, glucozamin-6-fosfat etc. (fig. 8.11).





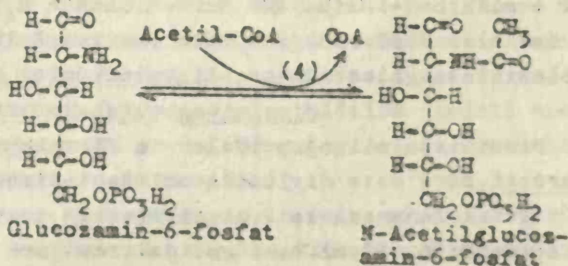


Fig. 8.11. Conversia fructozo-6-fosfatului în esterii fosforici ai unor monoglucide.
1 - Glucozofosfat-izomeraza; 2 - Manozofosfat-izomeraza; 3 - Glutamin-fructozo-6-fosfat-aminotransferaza;
4 - Fosfoglucozamin-acetiltransferaza.

Esterii 6-fosforici ai glucozei,manozei,glucozaminei etc., formaţi din fructozo-6-fosfat,servesc ca precursori în sinteza altor monoglucide sau a derivaţilor lor.

Transformările ulterioare ale monoglucidelor decurg de obicei prin intermediul nucleoziddifosfat-monoglucidelor(NuDP-monoglucidelor) care sînt formele active ale monoglucidelor,avînd rolul de importanţi agenţi de glicozilare(donori de resturi de monoglucide).Un exemplu îl oferă uridindifosfat-glucoza(UDP-glucoza) care se sintetizează din glucozo-6-fosfat pe calea a două reacţii catalizate de enzime diferite(fig.8.12).

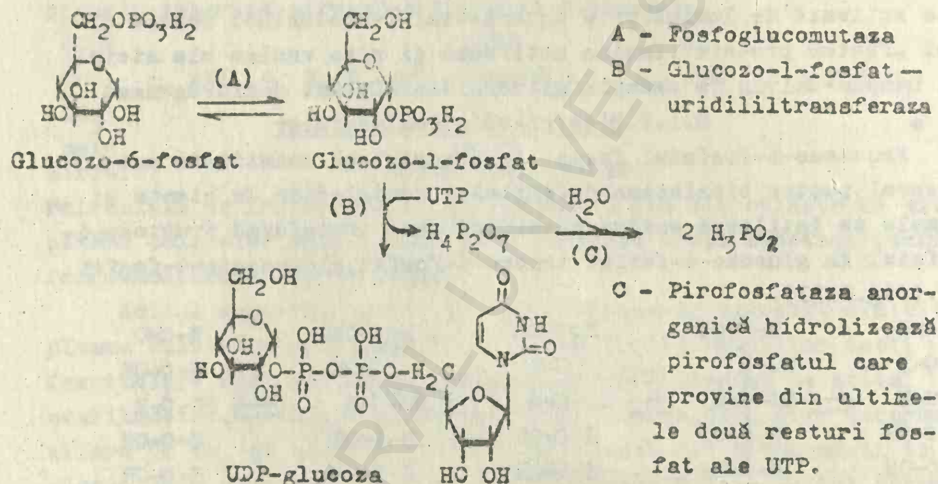


Fig.8.12.Sinteza UDP-glucozei din glucozo-6-fosfat. La plantele superioare enzimele A şi B sînt localizate în cloroplaste.

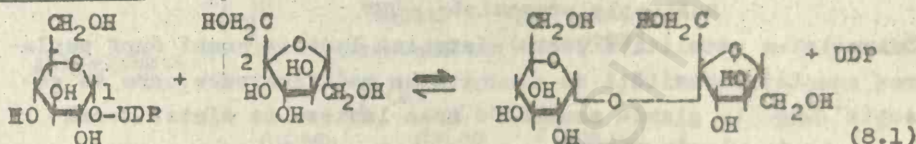
Biosinteza altor NuDP-monoglucide decurge pe căi analoage: NuTP + aldozo-1-fosfat $\rightleftharpoons$ NuDP-aldoză + $H_4P_2O_7$.Aldozo-1-fosfaţii, dar mai ales NuDP-monoglucidele participă la reacţiile implicate în biosinteza glicozidelor,oligoglucidelor şi poliglucidelor.

8.1.3.Biosinteza oligoglucidelor

Biosinteza oligoglucidelor va fi exemplificată cu biosinteza zaharozei,care este diglucida cu răspîndirea cea mai mare în regnul vegetal.Zaharoza se sintetizează în toate plantele verzi,unde serveşte în principal ca formă de transport a glucidelor,întrucît diglucida creează o presiune osmotică mai mică decît aceeaşi can-

titate de monoglucidă.

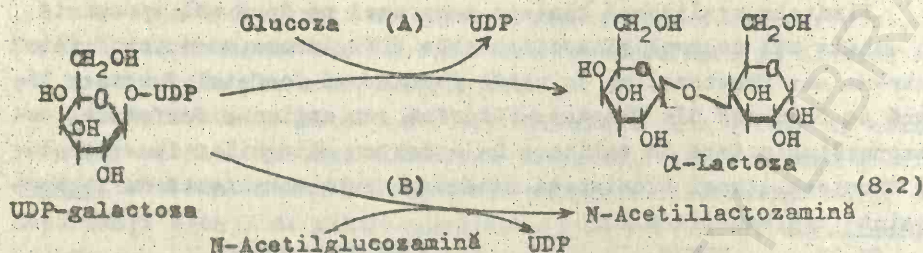
Plantele realizează sinteza zaharozei pe două căi apropiate. In ambele căi donorul glisozilic este UDP-glucoza,acceptorul fiind într-un caz fructoza,iar în altul fructozo-6-fosfatul.Fructoza liberă se formează din fructozo-6-fosfat sub acţiunea fosfatazei corespunzătoare.Dacă în calitate de acceptor glicozilic funcţionează fructoza,atunci biosinteza zaharozei este catalizată de zaharozosintetază(ecuaţia 8.1).



In cea de a doua cale de biosinteză a zaharozei participă UDP-glucoza şi fructozo-6-fosfatul,care se transformă sub acţiunea zaharozofosfat-sintetazei în UDP şi zaharozo-6^F-fosfat.Ultimul compus este hidrolizat de zaharozo-6-fosfatază în zaharoză şi fosfat. Zaharozofosfat-sintetaza poate utiliza numai UDP-glucoza,iar zaharozosintetaza lucrează cu UDP-glucoza,ADP-glucoza şi GDP-glucoza. Ambele transferaze,precum şi zaharozo-6-fosfataza se găsesc în cloroplaste.Cu toate acestea,în prezent a devenit clar că zaharoza se sintetizează în citoplasma celulelor fotosintetizante din UDP-glucoză şi fructozo-6-fosfat care ia naştere din dihidroxiacetonfosfat.Acesta se formează pe calea fotosintezei în cloroplaste de unde migrează în citoplasmă.Zaharozosintetaza ar avea rolul fiziologic principal de a scinda zaharoza în UDP-glucoză (sau ADP-glucoză)(ecuaţia 8.1) care este necesară pentru procesele biosintetice.

Un interes deosebit prezintă biosinteza lactozei(glucida principală din lapte),întrucît lactozosintetaza care catalizează reacţia A din ecuaţia 8.2,constituie un exemplu de modificare reglatoare a enzimei.Lactozosintetaza conţine o subunitate catalitică,denumită galactoziltransferază şi o subunitate modificatoare(care este α-lactalbumina).Subunitatea catalitică izolată este activă în transferul galactozei de la UDP-galactoză la N-acetilglucozamină formînd N-acetil-lactozamina.

Galactoziltransferaza este prezentă în cele mai multe ţesuturi unde participă în sinteza părţii glucidice din glicoproteine.



Subunitatea catalitică poate sintetiza lactoza numai după cuplarea acestei subunităţi cu subunitatea modificatoare,care se găseşte doar în glanda mamară.De acea lactoza se sintetizează exclusiv în glanda mamară.

8.1.4.Biosinteza poliglucidelor

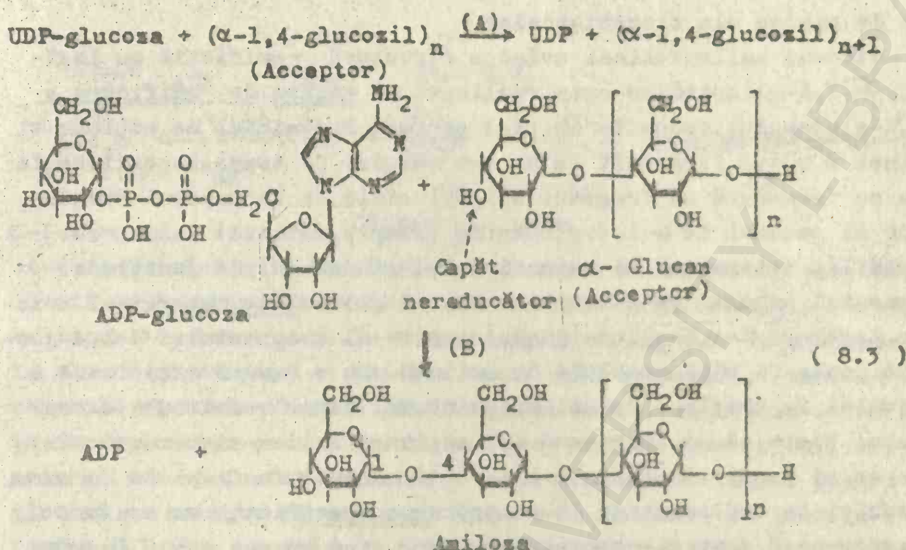
Poliglucidele se sintetizează în organismele vii prin unirea unui rest glicozilic activat,cedat de un donor,la capătul nereducător al moleculei de acceptor(de obicei oligoglucide sau poliglucide cu un număr mic de resturi de monoglucide).

8.1.4.1.Biosinteza amidonului.Amidonul se sintetizează în ...tide cu participarea mai multor enzime.Dintre ele,prima enzimă studiată a fost α-glucanfosforilaza(C.S.Hanes,1940) care catalizează reacţia:

$$\text{glucozo-1-fosfat} + (\alpha\text{-1,4-glucozil})_n \rightleftharpoons (\alpha\text{-1,4-glucozil})_{n+1} + P_i.$$

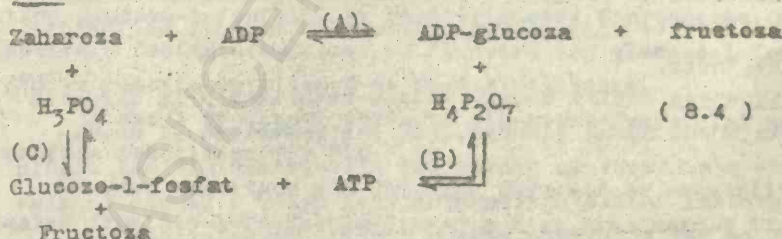
Deoarece reversibilitatea acestei reacţii depinde de raportul P_i/glucozo-1-fosfat,α-glucanfosforilaza poate fi implicată atît în scindarea cît şi în sinteza amidonului,cînd concentraţia glucozo-1-fosfatului în celulă atinge un nivel ridicat.Enzima poate să sintetizeze amidon de novo din glucozo-1-fosfat,folosind ca primer o oligoglucidă din seria maltozică,începînd cu maltotrioza(N.P.Badenhuizen,1973).

O nouă etapă în studiul anabolismului glucidelor a fost deschisă de cercetările lui L.F.Leloir şi colab.(1960,1961),care au arătat că NuDP-glucoza serveşte ca precursor în biosinteza amidonului şi glicogenului.Formarea amidonului din NuDP-glucoză se realizează sub acţiunea amidon-sintetazei care a fost descoperită în multe plante.Amidon-sintetaza poate folosi doi donori de glucoză:UDP-glucoza şi ADP-glucoza(ecuaţia 8.3).Se presupune că această proprietate a enzimei este strîns corelată cu mecanismul



de reglare a formării amilozei şi amilopectinei în molecula amidonului.

După T.Murata şi colab.(1964) glucoza din ADP-glucoză este inclusă predominant în amilopectină,iar cea din UDP-glucoză - în amiloză şi amilopectină.Totuşi cercetările din ultimii ani au dovedit specificitatea mai ridicată a amidon-sintetazei pentru ADP-glucoză.Formarea ADP-glucozei(ecuaţia 8.4) în plante se poate realiza din zaharoză sub acţiunea zaharozosintetazei(reacţia A) şi din glucozo-l-fosfat cu participarea ADP-glucoza—pirofosforilazei(reacţia B).Unele celule vegetale pot conţine zaharozefosforilază care catalizează reacţia (C).



Participarea α-glucanfosforilazei şi amidon-sintetazei în sinteza amidonului depinde probabil de condiţiile din celulă şi în primul rînd de compoziţia stromei.Prima enzimă se găseşte libe-

ră în stromă,pe cînd amidon-sintetaza este înglobată în grăuncioarele de amidon ale cloroplastelor.

Sinteza amilopectinei avînd o structură ramificată cu legături α-1,6-glicozidice este realizată de enzima de ramificare a α-1,4-glucanului,denumită inițial enzimăQ.Mecanismul de acțiune al enzimei Q poate fi privit ca un caz special de transglucozilare,în care se transferă un fragment oligoglucidic de la capătul nereducător al catenei de α-1,4-glucan(de exemplu,amiloză) la un rest glicozilic neterminal al catenei α-1,4-glucanului de joncțiune. Fragmentul adăugat se fixează la restul glicozilic neterminal printr-o legătură α-1,6-glicozidică.Acceptor al fragmentului α-1,4-glucanic poate fi altă moleculă de amiloză sau o ramură exterioară a moleculei în creștere de amilopectină.Mai departe molecula acceptorului poate să se lungească sub acțiunea amidon-sintetazei.Ramificarea și lungirea treptată a catenei conduce în final la formarea moleculei de amilopectină.In ce privește specificitatea enzimei Q, ea acționează asupra substratului donor cînd acesta are o lungime de cel puțin 40 resturi de glucoză.

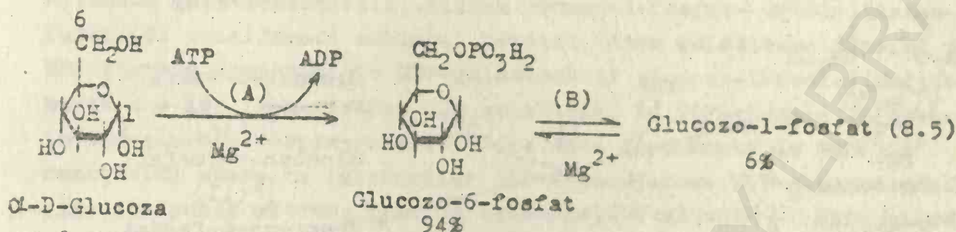
Mecanismul care determină raportul între amiloză și amilopectină în molecula de amidon nu este încă elucidat.

8.1.4.2.Biosinteza celulozei.Cu toată importanța problemei, detaliile privind biosinteza celulozei nu sînt complet lămurite. Celulozo-sintetazele folosesc ca donori de glucoză atît GDP-glucoza cît și UDP-glucoza.Natura acceptorului nu se cunoaște.

8.1.4.3.Biosinteza glicogenului.Glicogenul se sintetizează din glucoza furnizată de hrană,iar în cazul unui aport insuficient de glucide alimentare,el se formează din produșii rezultați în catabolismul lipidelor și proteinelor.Biosinteza glicogenului din monoglucide se numește glicogenogeneză,iar din compuși neglucidici - glicogenoneogeneză.

Glicogenogeneza.Dintre monoglucidele rezultate prin digestia glucidelor din hrană numai glucoza,fructoza,galactoza și manoza joacă rolul de precursori în biosinteza glicogenului.Primul stadiu al glicogenogenezei constă în transformarea celor 4 hexoze în glucozo-1-fosfat pe căi specifice pentru fiecare monoglucidă.

Conversia glucozei în glucozo-1-fosfat se realizează în două reacții catalizate de enzime diferite(ecuația 8.5).Formarea gluco-



zo-6-fosfatului prin fosforilarea glucozei de către ATP este catalizată de hexokinază(reacţia A).Tesuturile animale conţin diferite tipuri de hexokinaze.In creier,muşchi,eritrocite,de asemenea, în plante şi drojdie se găseşte hexokinaza nespecifică care este capabilă să fosforileze o gamă largă de hexoze la hexozo-6-fosfaţi.Caracteristic pentru hexokinaza nespecifică este inhibiţia ei prin glucozo-6-fosfat.Hexokinaza cu specificitate înaltă pentru glucoză se numeşte gluookinază.Ea nu este inhibată de glucozo-6-fosfat.Celulele hepatice posedă atît hexokinază cît şi glucokinază,însă ultima predomină în ficatul matur.Aceste enzime au rol distinct în metabolism.Hexokinaza participă în glicoliză,iar glucokinaza este implicată în depozitarea glucozei sub formă de glicogen.

Glucozo-6-fosfatul format în reacţia (A) este convertit în glucozo-1-fosfat sub acţiunea fosfoglucomutazei(reacţia B) care necesită Mg^{2+} şi glucozo-1,6-difosfatul drept coenzimă.In centrul catalitic al enzimei active se găseşte un rest de serină fosforilată.Enzima fosforilată cedează radicalul fosfat hidroxilului glicozidic din glucozo-6-fosfat,formînd glucozo-1,6-difosfatul. Acest intermediar transferă grupa fosfat de la C-6 enzimei rezultînd glucozo-1-fosfatul şi regenerîndu-se fosfoenzima.Coenzima necesară fosfoglucomutazei se formează din glucozo-1-fosfat şi ATP în reacţia catalizată de fosfoglucokinază.

In cazul fructozei,formarea glucozo-1-fosfatului are loc conform reacţiilor din fig.8.13.

O mare cantitate din fructoza ingerată se metabolizează pe calea fructozo-1-fosfatului(reacţia 2 şi următoarele în fig.8.13) datorită fructokinazei şi fructozo-1-fosfataldolazei.Alternativ, fructoza poate fi fosforilată la fructozo-6-fosfat sub influenţa hexokinazei.Mai departe fructoza este metabolizată prin intermediul glucozo-6-fosfatului.

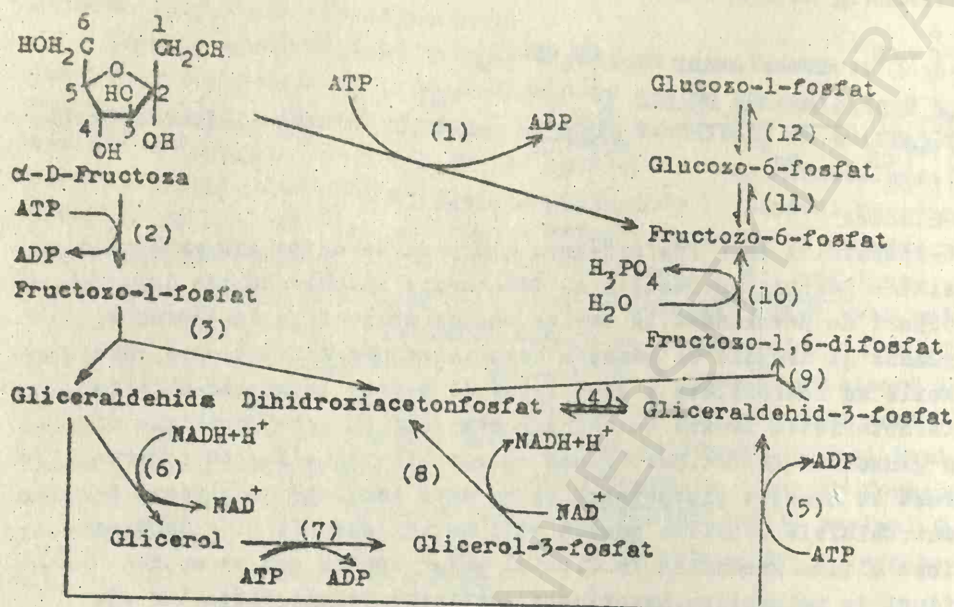
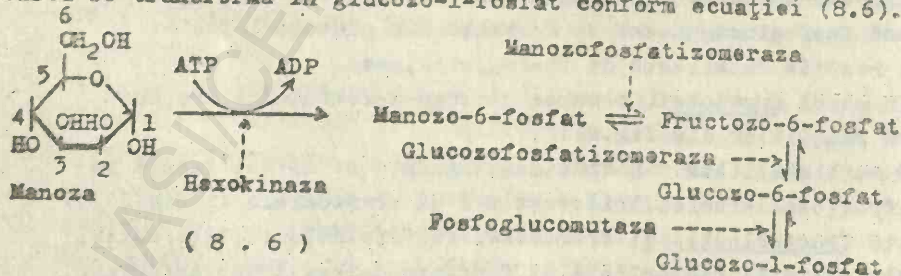


Fig.8.13.Schema reacţiilor de transformare a fructozei în glucozo-1-fosfat.Cifrele în paranteze indică enzimele care catalizează reacţiile: 1 - Hexokinaza;2 -Fructokinaza(cetohexokinaza;3 - Fructozo-1-fosfataldolaza;4- Triozofosfatizomeraza; 5 - Triozokinaza;6 - Alcooldehidrogenaza;7 - Glicerolkinaza;8 - Glicerolfosfatdehidrogenaza;9 - Fructozodifosfataldolaza;10 - Hexozodifosfataza;11 - glucozofosfatizomeraza;12 - Fosfoglucomutaza.

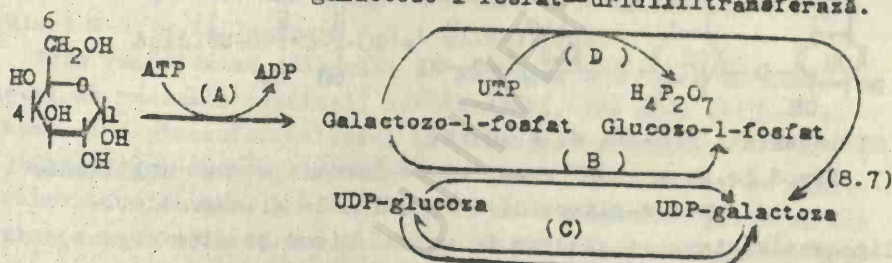
Cînd precursorul în biosinteza glicogenului este <u>manoza</u>,aceasta se transformă în glucozo-1-fosfat conform ecuaţiei (8.6).



(8 . 6)

<u>Galactoza</u>,rezultată prin hidroliza lactozei,este convertită în glucozo-1-fosfat în trei etape(ecuaţia 8.7).Metabolismul galactozei începe cu transfosforilarea ei în galactozo-1-fosfat,sub

acţiunea galactokinazei(A).Enzima hexozo-1-fosfat—uridililtransferaza(B) catalizează schimbul hexozei între galactozo-1-fosfat şi UDP-glucoză,conducînd la UDP-galactoză şi glucozo-1-fosfat.Mai departe are loc izomerizarea UDP-galactozei în UDP-glucoză în prezenţa UDP-glucozo-4-epimerazei(C) care este dependentă de NAD^+.In reacţia(C) apare ca intermediar UDP-4-cetohexoza.UDP-glucozo-4-epimeraza poate să transforme,de asemenea,UDP-glucoza în UDP-galactoză,dacă ultima este necesară pentru sinteza oligoglucidelor, poliglucidelor complexe,glicolipidelor şi glicoproteinelor.In organismul animalelor superioare UDP-galactoza poate să se formeze pe calea alternativă direct din galactozo-1-fosfat şi UTP,reacţia (D) fiind catalizată de galactozo-1-fosfat—uridililtransferază.



Absenţa enzimei hexozo-1-fosfat-uridililtransferaza(B) cauzează boala ereditară numită <u>galactozemie</u>,care se manifestă la copii nou-născuţi prin incapacitatea organismului de a metaboliza galactoza din lactoza conţinută în lapte,urmată de deranjamente ale tractului gastro-intestinal,afecţiuni ale ficatului,oprirea dezvoltării intelectuale şi cataractă.Metabolismul galactozei la indivizii cu galactozemie este blocat la nivelul galactozo-1-fosfatului,care se acumulează în eritrocite şi devine toxic pentru ficat şi creier.O altă substanţă toxică este probabil <u>galactitolul</u> care se formează prin reducerea galactozei.

<u>In cel de al doilea stadiu al biosintezei glicogenului</u>,glucozo-1-fosfatul,reacţionînd cu UTP,se transformă în UDP-glucoză, datorită acţiunii glucozo-1-fosfat—uridililtransferazei(reacţia B,fig.8.12).

UDP-glucoza joacă rolul de donor glicozilic în biosinteza glicogenului.Prin transferarea restului glucozil activat al UDP-glucozei la grupa hidroxil de la C-4 al radicalului terminal nere-

ducător de glucoză din molecula glicogenului se formează o nouă legătură α-1,4-glicozidică(fig.8.14).Această reacţie de elongaţie este catalizată de <u>glicogensintetază</u> care poate adăuga resturile de glucoză numai dacă lanţul poliglucidic acceptor conţine mai mult de 4 unităţi monomere.Prin urmare enzima necesită un <u>primer</u>.

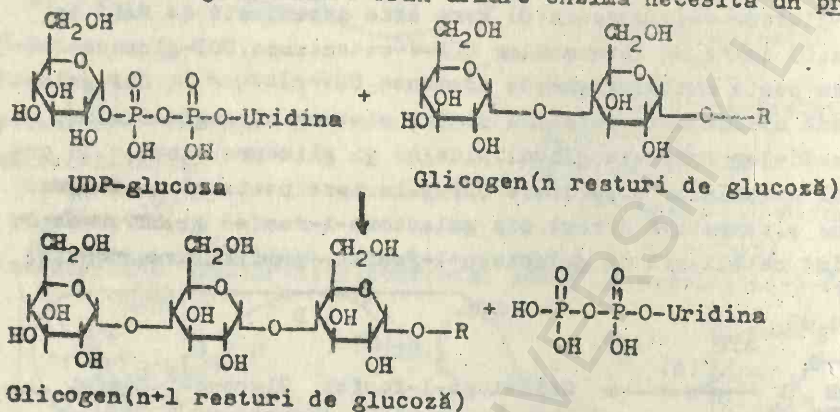


Fig.8.14.Mecanismul reacţiei de formare a unei noi legături α-1,4-glicozidice în molecula glicogenului.

Glicogensintetaza se găseşte în muşchi,ficat şi alte organe,unde poate exista sub două forme,care se deosebesc după cerinţa în glucozo-6-fosfat ca efector.Forma I(independentă de glucozo-6-fosfat) şi forma D(dependentă de glucozo-6-fosfat) reprezintă glicogensintetaza nefosforilată şi respectiv fosforilată.Glicogensintetaza D este inactivă în absenţa activatorului specific. Interconversia celor două forme se realizează sub acţiunea unei proteinkinaze dependentă de AMP ciclic(ecuaţia 8.9) şi a unei fosfoproteinfosfataze.In muşchiul în repaus,glicogensintetaza se află în stare activă(forma I).

Structura puternic ramificată,caracteristică pentru molecula de glicogen,este rezultatul acţiunii <u>amilo-(1,4→1,6)-transglicozilazei</u>.In ficat,muşchi şi creier această <u>enzimă de ramificare a glicogenului</u> scindează de la lanţurile exterioare ale poliglucidei fragmente de 6-7 unităţi glucozilice,legate prin legături α-1,4-glicozidice şi le transferă cu 8-12 unităţi mai departe în interiorul moleculei,cu formarea legăturii α-1,6-glicozidice(fig. 8.15).

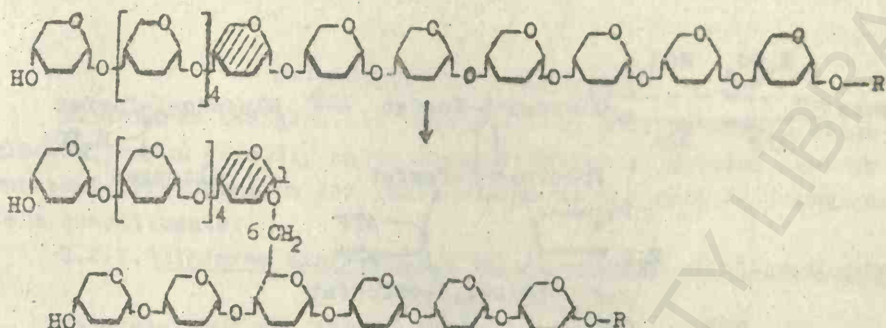


Fig.8.15.Acţiunea enzimei de ramificare.R - partea principală a moleculei de glicogen.Ciclul piranozic haşurat desemnează restul de glucoză din fragmentul care este transferat de la legătura α-1,4- la legătura α-1,6-glicozidică.

Prin ramificarea moleculei de glicogen se creează un număr crescut de radicali terminali nereducători,care sînt situsul de acţiune al α-glucanfosforilazei şi glicogensintetazei.

Glicogenoneogeneza.In cazul unui aport insuficient de glucide alimentare,ficatul are capacitatea de a sintetiza glicogen din substanţe neglucidice,care pot fi produşi ai catabolismului proteinic,lipidic şi glucidic.Oricare din substanţele care determină creşterea cantităţii de glicogen,constituie,de asemenea,un precursor în sinteza glucozei.De aceea procesele de gluconeogeneză şi glicogenoneogeneză,în esenţă,se bazează pe mecanisme comune. Astfel,acidul lactic format în muşchi prin degradarea anaerobă a glucidelor este transportat de sînge la ficat,unde aproximativ 1/5 se oxidează la CO_2,cu eliberare de energie,iar restul se transformă în glucoză.Aceasta serveşte la reaprovizionarea creierului,muşchiului scheletic şi miocardic,după cerinţele lor metabolice sau este folosită în biosinteza hepatică a glicogenului.

Glicogenoneogeneza reprezintă în mare parte inversarea reacţiilor de degradare oxidativă a glucidelor .Reacţiile ireversibile din glicoliză au fost ocolite prin alte reacţii(fig.8.16),catalizate de piruvatcarboxilază,fosfoenolpiruvatcarboxikinază,fructozodifosfatază şi glucozo-6-fosfatază.Fructozodifosfataza catalizează hidroliza exergonică a fructozo-1,6-difosfatului în fructozo-6-fosfat.Dacă concentraţia glucozei în sînge este mică,atunci în

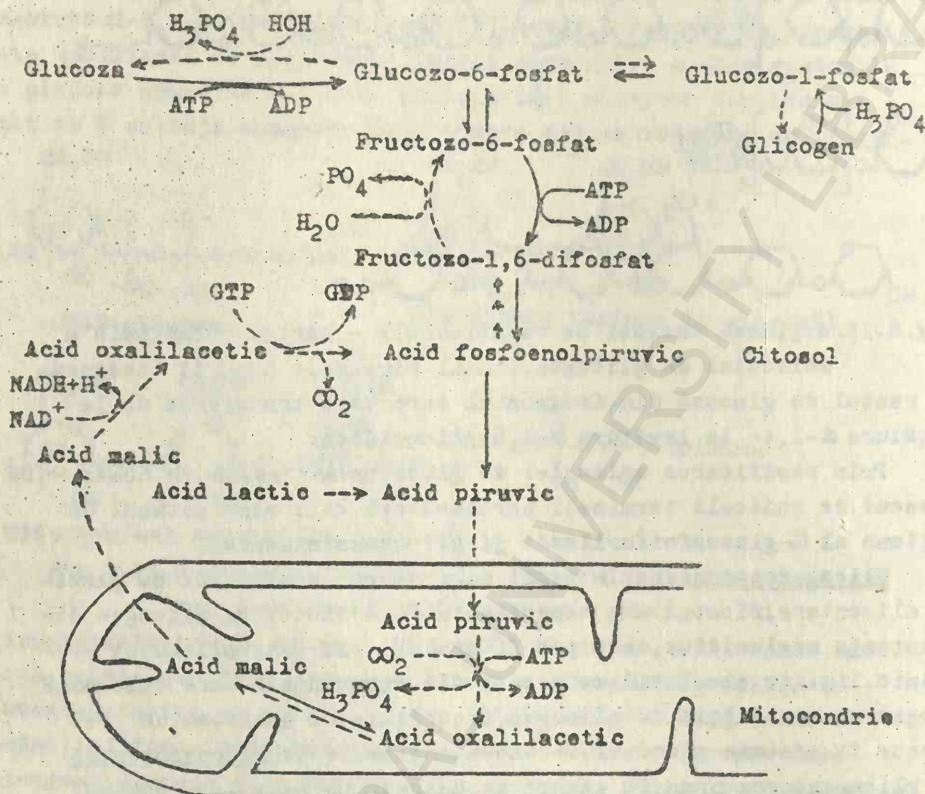


Fig.8.16.Sinteza glucozei şi glicogenului din acid lactic.
Săgeţile întrerupte indică calea gluconeogenetică şi glicogenoneogenetică de la acidul piruvic,prin intermediul acidului oxalilazetic şi acidului malic.Acidul lactic ajuns în ficat se oxidează la acid piruvic care pătrunde în mitocondrii.Aici,acidul piruvic este carboxilat la acid oxalilacetic,sub acţiunea piruvatcarboxilazei şi în prezenţa ATP.Malatdehidrogenaza mitocondrială reduce acidul oxalilacetic în acid malic.Acesta poate părăsi mitocondria,trecînd în cit...l,unde se oxidează din nou în acid oxalilacetic,care este trans...mat de fosfoenolpiruvatcarboxikinază şi GTP în acid fosfoenolpiruvic.Ultimul serveşte ca precursor în sinteza glucozei şi glicogenului.

ficat are loc hidroliza glucozo-6-fosfatului sub influenţa glucozo-6-fosfatazei(localizată în reticulul endoplasmatic),conducînd la glucoză liberă.O mare parte de glucozo-6-fosfat se transformă în glicogen.In muşchi glucozo-6-fosfataza aproape lipseşte.

8.2. CATABOLISMUL GLUCIDELOR

Eliberarea energiei din moleculele de poliglucide şi oligoglucide, precum şi modificarea proprietăţilor şi rolului acestor substanţe, presupune în prealabil scindarea lor pînă la monoglucidele constituente.

8.2.1. Scindarea enzimatică a poliglucidelor şi oligoglucidelor în celula vie

In organismul viu poliglucidele şi oligoglucidele sînt descompuse în combinaţii mai simple prin două tipuri de reacţii: hidroliza şi fosforoliza (vezi Glicogenoliza).

Hidroliza. Reacţiile de scindare hidrolitică a poliglucidelor şi oligoglucidelor sînt catalizate de enzime specifice din clasa hidrolazelor. Enzimele care hidrolizează legătura α-1,4-glicozidică în amidon, glicogen sau produşii lor de scindare se numesc amilaze. Se cunosc trei tipuri de amilaze. α-Amilaza este răspîndită în animale (salivă, pancreas, sînge etc.), plante, ciuperci şi bacterii. Ea acţionează asupra legăturilor α-1,4-glicozidice din interiorul moleculei de amidon şi glicogen; de aceea este o endoamilază. Ca produşi finali ai reacţiei catalizate de α-amilază se formează oligoglucidele numite dextrine şi o cantitate determinată de maltoză. α-Amilaza din diferite surse necesită Ca^{2+} în calitate de cofactor, care stabilizează structura secundară şi terţiară a enzimei, favorizînd conformaţia catalitic activă. Activitatea α-amilazei animale se manifestă în prezenţa Cl^-. Diversele α-amilaze se deosebesc prin masa moleculară, pH optim etc. Determinarea activităţii α-amilazei în serul sanguin se practică pentru diagnosticarea diferitelor boli (pancreatită).

β-Amilaza se găseşte în plantele superioare (orz, soia, grîu, cartof etc.). Ea hidrolizează legăturile α-1,4-glicozidice în amidon şi poliglucidele asemănătoare, eliberînd succesiv resturile de maltoză de la capătul nereducător al lanţului poliglucidic. Hidroliza amidonului sub acţiunea β-amilazei conduce la formarea β-maltozei, prin inversiune Walden, de unde denumirea enzimei. Amiloza este aproape complet hidrolizată de β-amilază. In cazul amilopectinei, acţiunea β-amilazei încetează cînd mai rămîn 2-3 unităţi glucozil pînă la punctele de ramificaţie. Restul moleculei de α-

glucan, asupra căruia nu mai acţionează β-amilaza, se numeşte dextrină-limită. Toate β-amilazele sînt inhibate de Cu, Hg, p-clormercuribenzoat, ceea ce dovedeşte prezenţa grupelor -SH în centrul activ al enzimei.

Glucoamilaza(γ-amilaza) catalizează hidroliza legăturilor α-1,4-glicozidice în amidon, glicogen, dextrani, scindînd succesiv resturile de glucoză de la capătul nereducător al moleculei de polizaharidă. Produşii finali ai acţiunii glucoamilazei asupra amidonului sînt glucoza şi dextrinele cu masă moleculară diferită. Enzima este larg răspîndită în microorganisme, ţesuturile animale etc.

Amilo-1,6-glucozidaza hidrolizează legăturile α-1,6-glicozidice, adică punctele de ramificaţie în moleculele de amilopectină şi glicogen, cu formarea de oligoglucide.

Oligo-1,6-glucozidaza(dextrinaza limită) scindează legăturile α-1,6-glicozidice în dextrinele-limită şi alte oligoglucide.

În mod analog cu scindarea amidonului şi glicogenului sînt hidrolizate celelalte poliglucide vegetale şi animale. De exemplu, celulaza hidrolizează legăturile β-1,4-glicozidice în celuloză, cu formarea de celobioză şi oligoglucide(celodextrine). Celulaza este foarte răspîndită la microorganisme, mai puţin în plante şi aproape deloc la animale. Chitinaza rupe hidrolitic legăturile β-1,4-glicozidice în chitină şi chitodextrină.

La rîndul lor, diglucidele apărute prin hidroliza poliglucidelor şi oligoglucidelor sau diglucidele existente în organismul viu sînt hidrolizate sub influenţa α- şi β-glicozidazelor, cu formarea monoglucidelor corespunzătoare. Unele din aceste enzime se menţionează în tabelul 8.1.

Catabolismul glucidelor în organismul viu poate să decurgă în lipsa oxigenului, adică în condiţii anaerobe(anoxibiotice) cît şi cu participarea oxigenului, deci în condiţii aerobe(oxibiotice).

8.2.2. Degradarea anaerobă a glucidelor

Degradarea anaerobă a glucidelor este o formă de eliberare a energiei din moleculele lor, filogenetic foarte veche, prezentă în toate celulele vii.

8.2.2.1. Glicoliza. Dintre monoglucide, organismul viu utilizează preferenţial glucoza. Totalitatea reacţiilor enzimatice de

Tabelul 8.1. Exemple de α- şi β-glicozidaze care hidrolizează diglucidele şi alte oligoglucide.

Denumirea enzimei	Substratul	Legătura hidrolizată	Produşi de reacţie	Răspîndirea enzimei
α-Glucozidaza(Maltaza)	α-D-Glucopiranozide (Maltoza)	Legătura α-1,4-glucozidică	α-D-Glucoza + α-D-Glucoza	Salivă, intestin, plante superioare, ciuperci, bacterii
β-Galactozidaza(Lactaza)	Lactoza	Legătura β-1,4-galactozidică	β-D-Galactoza + α-D-Glucoza	Glande mamare, intestinul subţire, drojdiile lactozice, ciuperci, bacterii
β-Fructofuranozidaza(zaharaza, invertaza)	Zaharoza	Legătura C-β-glicozilic al restului de fructoză	α-D-Glucoza + β-D-Fructoza	Microorganisme (drojdii), plante superioare, intestinul animalelor
β-Glucozidaza(celobiaza, genţiobiaza)	β-D-Glucopiranozide (celobioza, genţiobioza)	Legătura β-1,4-glucozidică	β-D-Glucoza + β-D-Glucoza	Bacterii, ciuperci, unele plante superioare
α-Galactozidaza(melibiaza)	Galactozide(rafinoza, melibioza)	Legătura α-1,4-galactozidică	α-Galactoza + zaharoza	Drojdii de bere, ciuperci

catabolizare anaerobă a glucozei pînă la acid lactic, cu eliberarea de energie, se numeşte glicoliză. După numele cercetătorilor care au avut o contribuţie mai largă la elucidarea mecanismului glicolizei, ea se mai denumeşte calea Embden-Meyerhof-Parnas (calea EMP). Etapele succesive ale glicolizei sînt redate în fig.8.17. In prima etapă (reacţia (1) în fig.8.17) a glicolizei, hexokinaza catalizează transferul restului de fosfat terminal de la ATP la grupa hidroxil a C-6 din molecula de glucoză liberă, formînd glucozo-6-fosfat (esterul lui Robinson). Intrucît glucozo-6-fosfatul este o formă mobilă a glucozei, adică o formă participantă la toate căile metabolis-

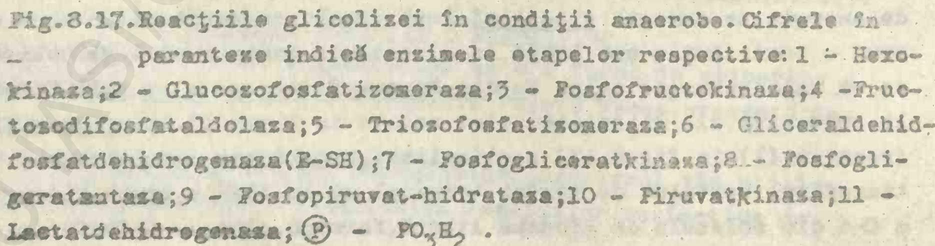


Fig.8.17.Reacţiile glicolizei în condiţii anaerobe.Cifrele în paranteze indică enzimele etapelor respective: 1 - Hexokinaza;2 - Glucozofosfatizomeraza;3 - Fosfofructokinaza;4 -Fructozodifosfataldolaza;5 - Triozofosfatizomeraza;6 - Gliceraldehidfosfatdehidrogenaza(E-SH);7 - Fosfogliceratkinaza;8 - Fosfogligeratmutaza;9 - Fosfopiruvat-hidrataza;10 - Piruvatkinaza;11 - Lactatdehidrogenaza; (P) - PO_3H_2 .

mului glucidic,hexokinazele care catalizează reacţia (1) sînt foarte răspîndite în organismele vii.Hexokinazele necesită Mg^{2+} pentru activitatea lor şi au o specificitate largă(vezi 8.1.4.3).

Etapa a (2) a glicolizei o constituie izomerizarea glucozo-6-fosfatului în fructozo-6-fosfat(ester Neuberg),sub acţiunea glucozofosfat-izomerazei.Reacţia (2) este reversibilă şi la echilibru raportul aldozofosfat: cetozofosfat = 7:3 .

In etapa a(3),fosfofructokinaza realizează,cu participarea ATP şi Mg^{2+} fosforilarea fructozo-6-fosfatului la fructozo-1,6-difosfat(esterul lui Harden-Young sau Ivanov).Etapa a (3) este o reacţie caracteristică şi limitativă în glicoliză.Activitatea fosfofructokinazei este controlată allosteric,fiind inhibată de ATP şi citrat şi stimulată de ADP şi AMP.Cu alte cuvinte,fosfofructokinaza este mai activă cînd celula are o încărcare energetică scăzută.Din reacţiile (1)-(3) se vede că pentru conversia glucozei în fructozo-1,6-difosfat s-a utilizat energia rezultată prin scindarea a 2 ATP.

In etapa a (4) fructozo-1,6-difosfatul este scindat între C-3 şi C-4,de către fructozodifosfataldolază în doi triozofosfaţi izomeri: dihidroxiacetonfosfatul şi gliceraldehid-3-fosfatul. Reacţia (4) este reversibilă,echilibrul ei fiind puternic deplasat în direcţia formării fructozo-1,6-difosfatului(89%).Fructozodifosfataldolaza este foarte răspîndită în regnul animal şi vegetal.Enzima din muşchi nu reclamă prezenţa ionilor metalici,însă enzima din drojdii şi multe bacterii este activată de Fe^{2+}, Co^{2+} sau Zn^{2+}.

Etapa a (5) cuprinde interconversia dihidroxiacetonfosfatului(cetoză) şi gliceraldehid-3-fosfatului(aldoză) care este catalizată de triozofosfatizomerază.Aceasta este cea mai activă din enzimele participante la glicoliză.Reacţia (5) este reversibilă, echilibrul între cei doi triozofosfaţi stabilindu-se pentru 96% dihidroxiacetonfosfat.In acest mod,metabolismul ambilor triozofosfaţi poate continua pe cale glicolizei.In acelaşi timp,pentru dihidroxiacetonfosfat există şi altă posibilitate,legată cu reducerea lui în glicerolfosfat(vezi MEtabolismul lipidelor).

Etapa a (6) constă în oxidarea gliceraldehid-3-fosfatului la acid 1,3-difosfogliceric,reacţie puternic exergonică,catalizată de

gliceraldehidfosfat-dehidrogenază(E-SH). Această enzimă posedă în centrul activ o grupare -SH și NAD^+ drept coenzimă. Energia eliberată prin oxidarea aldehidei, se acumulează în produșii de reacție după următorul mecanism. Substratul se unește prin intermediul >C=O cu situsul activ al enzimei, cînd ia naștere un tiosemiacetal, care este dehidrogenat de NAD^+ pînă la tioesterul acil-S-enzimă, conținînd o legătură macroergică. Concomitent coenzima se reduce la NADH. Aceeași enzimă catalizează fosforoliza acil-tioesterului, transferînd radicalul acil la acidul fosforic, cu formarea acidului 1,3-difosfogliceric (compus macroergic) și regenerarea HS-E. Etapa a (6), unica reacție oxidativă din glicoliză, se mai numește reacție de oxidoreducție glicolitică.

In etapa a (7) are loc, sub acțiunea fosfogliceratkinazei transferul restului de fosfat macroergic din poziția 1 a acidului 1,3-difosfogliceric la ADP, generînd acidul 3-fosfogliceric și ATP. Reacția kinazică (7) are o importanță deosebită în glicoliză, întrucît energia eliberată în oxidarea gliceraldehid-3-fosfatului se depozitează în ATP. Deoarece dintr-o moleculă de glucoză rezultă două molecule de acid 1,3-difosfogliceric, în această etapă a glicolizei se sintetizează 2 ATP .

In etapa a (8), acidul 3-fosfogliceric suferă o rearanjare intramoleculară, fiind transformat de fosfogliceratmutază în acid 2-fosfogliceric. Această enzimă necesită acidul 2,3-difosfogliceric în calitate de coenzimă.

In etapa a (9) se produce dehidratarea acidului 2-fosfogliceric în prezența fosfopiruvat-hidratazei (enolazei) și se formează acidul fosfoenolpiruvic, care este un compus macroergic. Ionii de Mg^{2+}, Mn^{2+} sau Zn^{2+} activează fosfopiruvat-hidrataza, iar F^- o inhibă.

In etapa a (10), piruvatkinaza transferă radicalul fosfat cu rezerva de energie de la acidul fosfoenolpiruvic la ADP. Se formează ATP și acid enolpiruvic, care se tautomerizează spontan în acidul piruvic. Deoarece fiecare moleculă de glucoză se degradează în două molecule de acid fosfoenolpiruvic și în etapa (10) rezultă 2 ATP. Acțiunea piruvatkinazei necesită Mg^{2+}. Ionul Ca^{2+} are acțiune antagonistă Mg^{2+}, deci reprimă enzima. Acidul piruvic ocupă o poziție centrală în metabolismul glucidelor. Succesiunea reacțiilor

de la glucoză la acidul piruvic este foarte similară în toate organismele şi în toate tipurile de celule.Metabolizarea ulterioară a acidului piruvic se distinge prin varietate.

In ultima etapă (11) a glicolizei,încondiţii anaerobe,acidul piruvic primind 2H de la $NADH+H^+$ se reduce la acid L-lactic.Reacţia (11) este reversibilă şi se efectuează datorită lactatdehidrogenazei,enzimă prezentă în organismele superioare şi microorganisme.Conversia NADH în NAD^+ sub influenţa lactatdehidrogenazei constituie calea principală care asigură posibilitatea desfăşurării neîntrerupte a reacţiei (6) în care se formează NADH.

Sumînd toate reacţiile discutate,se obţine următoarea ecuaţie pentru glicoliză:

$C_6H_{12}O_6 + 2ATP + 2H_3PO_4 + 2ADP \longrightarrow 2CH_3CHOHCOOH + 4\ ATP$.Scăzînd din 4 ATP cele 2 ATP consumate în reacţiile (1)-(3),se constată că randamentul energetic al degradării anaerobe a glucozei la acid lactic este de 2 ATP.Glicoliza se observă în toate celulele animale şi vegetale consumatoare de energie,precum şi în microorganisme.Majoritatea enzimelor glicolizei sînt localizate în citosol.Deşi glicoliza este o cale metabolică reversibilă,reacţiile (1),(3) şi (10) sînt practic ireversibile,în direcţia opusă avînd o viteză neînsemnată fiziologic.

8.2.2.2.Glicogenoliza.In ficat,muşchi etc. se găseşte un conţinut apreciabil de glicogen,care în condiţiile unei aprovizionări limitate cu oxigen,constituie o rezervă de energie uşor mobilizabilă.Conversia anaerobă a glicogenului la acid lactic se numeşte glicogenoliză.Acest proces începe cu fosforoliza glicogenului în prezenţa H_3PO_4,reacţia fiind catalizată de α-glucanfosforilază(glicogenfosforilază).Glicogenfosforilaza atacă molecula de glicogen de la capătul nereducător al fiecărei catene poliglucidice,clivînd legăturile α-1,4-glicozidice dintre resturile succesive de glucoză,cu formarea glucozo-1-fosfatului(fig.8.18).Acţiunea fosforilazei se opreşte cînd mai sînt 4 resturi de glucoză pînă la punctul de ramificaţie.In această fază intervine altă enzimă,oligo-(α-1,4→α-1,4)-glucantransferaza care transferă un fragment de 3 resturi de glucoză de pe un lanţ exterior pe altul. Astfel se măreşte lungimea lanţului cu legături α-1,4-glicozidice şi rămîne un singur rest de glucoză în punctul de ramificaţie.

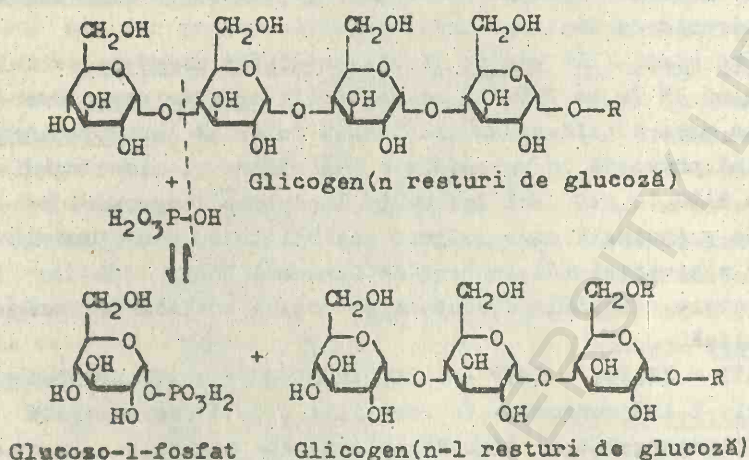
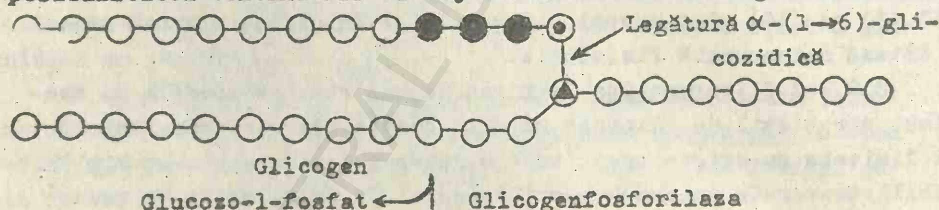


Fig.8.18.Fosforoliza glicogenului.

Scindarea hidrolitică de către α-1,6-glucozidază a glucozei legate prin legătură α-1,6-glicozidică în punctul de ramificaţie,dă posibilitatea continuării clivajului fosforolitic(fig.8.19).



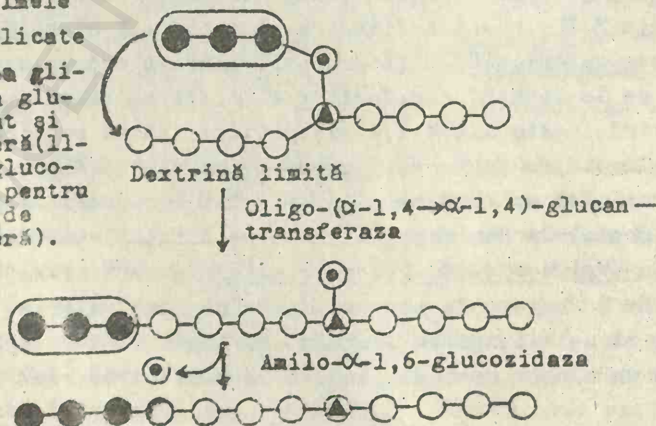


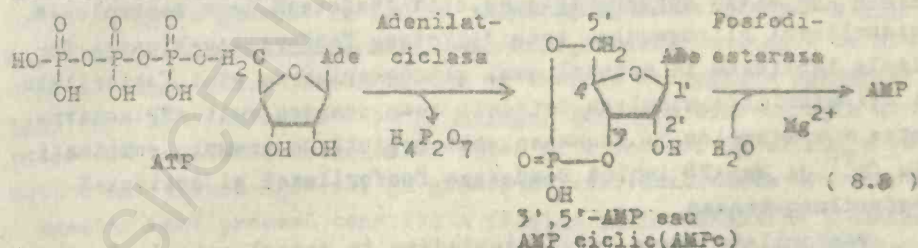
Fig.8.19.Enzimele implicate în degradarea glicogenului la glucozo-1-fosfat şi glucoză liberă(11-14 moli de glucozo-1-fosfat pentru fiecare mol de glucoză liberă).

Fosforilaza ocupă o poziţie cheie în procesul de catabolizare a glicogenului,fiind supusă unei reglări complexe.Fosforilaza din muşchi(5% din proteinele musculare solubile) şi ficat există în 2 forme diferite,interconvertibile: una activă,numită <u>fosforilaza a</u> şi alta inactivă - <u>fosforilaza b</u>.Fosforilaza <u>a</u> din muşchi este un tetramer alcătuit din 4 subunităţi identice,fiecare conţinînd un mol piridoxalfosfat(vezi Vitamina B_6) şi un rest de acid fosforic grefat la un radical specific de serină din lanţul polipeptidic. Fosforilaza <u>b</u> reprezintă un dimer din două subunităţi în fiecare găsindu-se cîte un mol de piridoxalfosfat.Transformarea fosforilazei <u>b</u> în fosforilază <u>a</u> are loc în prezenţa ATP şi a Mg^{2+},sub acţiunea fosforilazo-kinazei,conform reacţiei:



$$2\ \text{Fosforilază b} + 4\ ATP \longrightarrow \text{Fosforilaza a} + 4\ ADP\ .$$

La rîndul ei fosforilazo-kinaza este reglată prin două mecanisme principale.Fosforilazo-kinaza poate fi activată parţial de Ca^{2+} care se eliberează în sarcoplasmă din reticulul sarcoplasmatic,ca răspuns la contracţia musculară iniţiată de impulsul nervos.In acest mod,Ca^{2+} cuplează contracţia musculară şi stimulează glicogenoliza.Alt mecanism de reglare a activităţii fosforilazo-kinazei constă în modificarea ei covalentă prin fosforilare,catalizată de o <u>proteinkinază(fosforilazokinazo-kinaza</u>),în prezenţa ATP şi Mg^{2+}. Această proteinkinază,care conţine o subunitate reglatoare şi una catalitică este activată de 3',5'-AMP(AMP ciclic).Ultimul se sintetizează din ATP sub acţiunea <u>adenilatciclazei</u>(ecuaţia 8.8),enzimă asociată cu membrana plasmatică.Activitatea adenilatciclazei



este stimulată de anumiţi hormoni: adrenalina şi glucagon(fig.8.20). Activarea adenilatciclazei de către cei doi hormoni stă la baza mecanismului fin de creştere a concentraţiei de glucoză în sînge sub acţiunea adrenalinei(care stimulează catabolismul glicogenului hepatic şi muscular) şi glucagonului(care acţionează numai

asupra glicogenului din ficat).

Adrenalină Glucagon
Adenilatciclaza
ATP → AMPc
Proteinkinază (inactivă) → Proteinkinază (activă)
Fosforilazo-kinaza (forma inactivă) → Fosforilazo-kinaza (Forma activă)
4 ATP ⇩ 4 ADP
Fosforilaza b ⇄ Fosforilaza a
4 H_3PO_4 4 H_2O
H_3PO_4
Glicogen (n resturi de glucoză) → Glicogen (n-1 resturi de glucoză) + Glucozo-1-fosfat

Fig.8.20.Schema mecanismului în cascadă de reglare a scindării glicogenului sub acţiunea glicogenfosforilazei.

O particularitate caracteristică a mecanismelor reglatoare bazate pe modificarea reversibilă a protein-enzimelor constă în existenţa unor fosfoproteinfosfataze specifice care aduc protein-enzimele modificate în starea lor iniţială „de repaus".De exemplu,AMP ciclic este hidrolizat de către fosfodiesterază(ecuaţia 8.8) la AMP.Conversia fosforilazei a în fosforilază b este catalizată de fosfataza fosforilazei a.De fapt,pentru fiecare kinază există fosfataza corespunzătoare.Altă fosfatază care controlează catabolismul glicogenului este fosfataza fosforilazo-kinazei.Enzimele implicate în metabolismul glicogenului nu sînt fosforilate şi defosforilate simultan,întrucît s-ar consuma mult ATP.Activitatea fosfatazelor,de asemenea,este reglată.De exemplu,combinaţiile Ca^{2+} şi Mg-ATP inhibă fosfataza fosforilazei şi activează fosforilazo-kinaza.

Fosforilaza are o largă răspîndire în regnul animal şi vegetal.In fosforilaza vegetală se găsesc 2 moli de piridoxalfosfat şi lipseşte H_3PO_4.Se cunosc şi fosforilaze ale oligoglucidelor. Spre deosebire de α-glucanfosforilaza animală,fosforilazele din plante au un rol important în sinteza poliglucidelor şi oligoglucidelor.

Următoarea etapă a glicogenolizei presupune izomerizarea glucozo-1-fosfatului în glucozo-6-fosfat, catalizată de fosfoglucomutază (vezi 8.1.2).

Mai departe, glucozo-6-fosfatul obţinut din glucozo-1-fosfatul format prin fosforoliza glicogenului, urmează calea glicolizei, fiind scindat în 2 moli de acid lactic. Randamentul energetic în glicogenoliză este de 3 ATP, întrucît se cheltuieşte numai o moleculă de ATP din cele 4 ATP rezultate pentru fiecare rest de glucoză. Insă glicogenogeneza este un proces endergonic şi prin urmare glicogenoliza nu poate fi considerată mai eficientă energetic decît glicoliza.

8.2.2.3. Particularităţi caracteristice glicolizei şi glicogenolizei. Glicoliza şi glicogenoliza au loc cu viteze diferite de la ţesut la ţesut, în raport cu activitatea funcţională a fiecăruia. De exemplu, în ficat desfăşurarea normală a glicogenolizei se schimbă datorită prezenţei fosfatazelor care scindează esterii hexozofosforici. Glucozo-6-fosfatul rezultat din glucozo-1-fosfat sau din alţi precursori doar parţial se transformă în acid lactic. O parte din glucozo-6-fosfat serveşte ca sursă de glucoză liberă care se formează în reacţia catalizată de glucozo-6-fosfatază, evidenţiată, de asemenea, în rinichi şi intestin. Datorită acţiunii fosfatazelor, se asigură pătrunderea glucozei libere şi fructozei în sînge şi transportul acestora spre alte organe. Sîngele care iese din ficat conţine numai glucoză într-o concentraţie aproape constantă. Cantitatea în mg de glucoză la 100 ml sînge integral se numeşte glicemie. Menţinerea unei concentraţii normale, relativ constantă de glucoză în sînge poate să constituie un exemplu de reglare homeostatică, care se realizează după principiul feedback. Concentraţia glucozei în sînge este determinată între alţi factori de vitezele relative ale gluconeogenezei şi glicogenolizei. Realizarea coordonată a acestor două procese constituie funcţia glicogenolitică a ficatului, care reprezintă depozitul central de glicogen al organismului animal. Unele mecanisme de control ale glicolizei se exercită la nivelul hexokinazei, fosfofructokinazei şi piruvatkinazei care catalizează reacţii ireversibile.

In mod specific se realizează scindarea anaerobă a glucozei în eritrocite. In aceste celule o activitate ridicată posedă difos-

fogliceratmutaza care transformă acidul 1,3-difosfogliceric în acid 2,3-difosfogliceric(2,3-DPG).Ultima combinaţie se acumulează în eritrocite unde îndeplineşte funcţia de reglator al transportului de O_2(scade afinitatea hemoglobinei pentru O_2 şi stabilizează hemoglobina deoxigenată).Spre deosebire de eritrocite,în muşchi este foarte activă 2,3-difosfogliceratfosfataza care converteşte acidul 2,3-DPG în acid 3-fosfogliceric.

In creier şi muşchiul cardiac predomină glicoliza.In muşchii scheletici glicoliza şi glicogenoliza se desfăşoară,în general,cu aceeaşi intensitate.O cantitate apreciabilă de acid lactic se formează în muşchi mai ales prin executarea unui efort intens şi de scurtă durată.O parte din acidul lactic difuzează din muşchii scheletici activi în sînge care-l transportă la ficat,unde din nou se oxidează în piruvat,care predominant se transformă în glucoză(vezi Glicogenoneogeneza).Ultima pătrunde din nou în sînge şi reaprovizionează muşchii,unde se foloseşte în sinteza glicogenului.Aceste transformări constituie ciclul Cori.Conform ultimelor date,la om ciclul Cori se realizează doar în limite foarte restrînse.Majoritatea acidului lactic se transformă în glicogen chiar în muşchi cînd ei se află în repaus.

8.2.3.Fermentaţia glucidelor de către microorganisme

Prin fermentaţie se înţelege degradarea anaerobă a glucidelor sub acţiunea microorganismelor,în scopul obţinerii energiei necesare activităţii lor fiziologice.După produsul final care predomină cantitativ şi caracterizează procesul,fermentaţia poate fi alcoolică,acetică,lactică,propionică,butirică,citrică etc.Unele procese de fermentaţie se cunosc din cele mai vechi timpuri,avînd largi aplicaţii practice în industria chimică,alimentară, textilă etc.

Fermentaţia alcoolică este realizată de multe drojdii,diferite ciuperci şi unele bacterii care catabolizează glucoza în alcool etilic şi CO_2.Substratul iniţial al fermentaţiei alcoolice îl constituie glucoza liberă din sucurile de fructe,glucoza obţinută din maltoză şi zaharoză sau din amidon,ultimul fiind supus mai întîi zaharificării cu ajutorul amilazelor.Intrucît levurile nu conţin amilaze,mediul de fermentaţie se suplimentează cu malţ (orz încolţit) sau preparate amilazice izolate din ciuperci.Mal-

toza formată din amidon sub acţiunea amilazelor este scindată apoi în glucoză de către maltaza din levuri.

Fermentaţia alcoolică decurge după un mecanism care este identic, pînă la etapa de formare a acidului piruvic inclusiv, cu secvenţa reacţiilor din glicoliză. Spre deosebire de glicoliză, acidul piruvic în fermentaţia alcoolică este supus decarboxilării ireversibile în acetaldehidă sub acţiunea piruvatdecarboxilazei, care are drept coenzimă TPP(fig.8.21, reacţia 11). Degajarea CO_2 este o caracteristică pentru fermentaţia alcoolică. In etapa finală a fermentaţiei alcoolice, alcooldehidrogenaza reduce cu ajutorul NADH acetaldehida în alcool etilic(fig.8.21, reacţia 12). Ecuaţia sumară a procesului de fermentaţie alcoolică a glucozei poate fi redată astfel: $C_6H_{12}O_6 + 2\ H_3PO_4 + 2\ ADP \longrightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2 + 2\ ATP$.

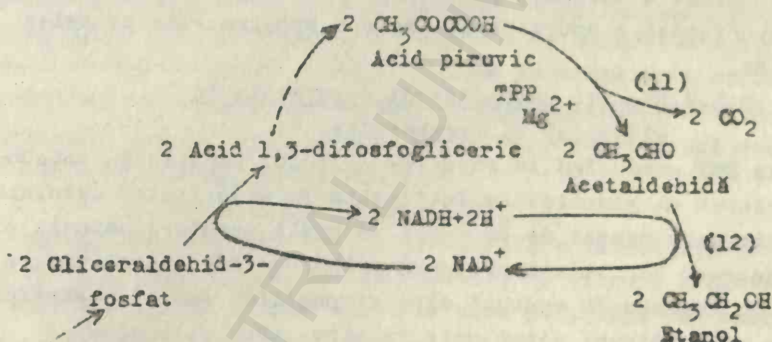


Fig.8.21. Unele etape ale fermentaţiei glucozei în alcool etilic, unde 11 - piruvatdecarboxilaza, 12 - alcooldehidrogenaza şi TPP - tiaminpirofosfat.

Deci prin catabolizarea unei molecule de glucoză pe calea fermentaţiei alcoolice se sintetizează 2ATP. Insemnătatea fiziologică a fermentaţiei alcoolice constă în faptul că asigură creşterea şi înmulţirea microorganismelor respective, prin folosirea glucozei ca substanţă nutritivă.

Degradarea anaerobă a glucozei reprezintă cea mai veche, de asemenea cea mai simplă cale de obţinere a energiei de către celulele vii. Conform teoriilor moderne despre originea vieţii pe Terra, organismele anaerobe au existat cu mult înainte de apariţia O_2 în atmosfera terestră. Numai după realizarea fotosintezei a

apărut viaţa aerobă, ceea ce a condiţionat apariţia şi existenţa organismelor superior dezvoltate.

Efectul Pasteur. Prin schimbarea condiţiilor anaerobe cu metabolismul aerob se observă o scădere a procesului de transformare a glucozei şi formarea etanolului se întrerupe. Acest fenomen se numeşte efect Pasteur. După cît se pare, efectul Pasteur este determinat de încărcarea energetică diferită a celulelor în condiţii aerobe şi anaerobe. In prezenţa O_2, lanţul respirator şi fosforilarea la nivelul substratului în glicoliză concurează pentru ADP. In plus, activitatea fosfofructokinazei depinde de conţinutul de ATP şi citrat. In anaerobioză activitatea fosfofructokinazei creşte, întrucît ea este stimulată de ADP şi AMP; în acest mod, pentru enzimele care catalizează reacţiile de fosforilare la nivelul substratului, devine accesibilă o cantitate mai mare de ADP. Toate acestea favorizează o scurgere mai mare a substratelor pe calea glicolitică.

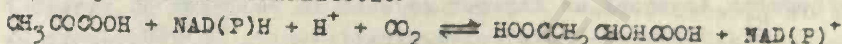
8.2.4. Reacţii secundare şi colaterale în glicoliză şi fermentaţie

Calea EMP, conducînd la formarea acidului piruvic în catabolismul anaerob al glucozei se întîlneşte în majoritatea celulelor, cu excepţia unor specii de bacterii. In unele ţesuturi animale glicoliza anaerobă reprezintă procesul principal de catabolizare a glucozei. De exemplu, în muşchii albi ai peştilor sau ai păsărilor domestice metabolismul aerob este relativ redus şi predomină scindarea glucozei în acid lactic. In cristalinul şi corneea ochiului uman, ţesuturi slab aprovizionate cu O_2, energia se obţine cu preponderenţă prin catabolizarea anaerobă a glucozei la acid lactic.

Cursul fermentaţiei glucozei de către microorganisme se schimbă puternic în funcţie de condiţiile concrete. Dacă în mediul de fermentaţie se adaugă bisulfit, acesta reacţionează cu acetaldehida dînd un aduct şi se blochează reducerea ei în etanol. Celulele de drojdie se adaptează la aceste condiţii, folosind NADH pentru reducerea dihidroxiacetonfosfatului în glicerol. Glicerolfosfatdehidrogenaza catalizează conversia dihidroxiacetonfosfatului în L-α-glicerolfosfat, care este scindat de glicerolfosfatază în glicerol.

Reducerea dihidroxiacetonfosfatului în glicerolfosfat are loc de asemenea în ţesuturile animale. In muşchii insectelor zburătoare reacţia menţionată reprezintă probabil o cale alternativă în obţinerea acidului lactic. In ţesutul muscular reacţia catalizată de glicerolfosfatdehidrogenază serveşte ca mijloc de transport în mitocondrii a echivalenţilor reducători obţinuţi de la NADH citoplasmatică. Valoarea K_M comparativ mică a enzimei din ficat pledează că aici enzima ar avea rol principal în producerea glicerolului pentru sinteza lipidelor.

Altă transformare importantă a acidului piruvic în glicoliză şi fermentaţie este reacţia de carboxilare care conduce la acidul malic şi acidul oxalilacetic:



$$CH_3COCOOH + NAD(P)H + H^+ + CO_2 \rightleftharpoons HOOCCH_2CHOHCOOH + NAD(P)^+$$



$$CH_3COCOOH + ATP + CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HOOCCH_2COCOOH + ADP + H_3PO_4$$

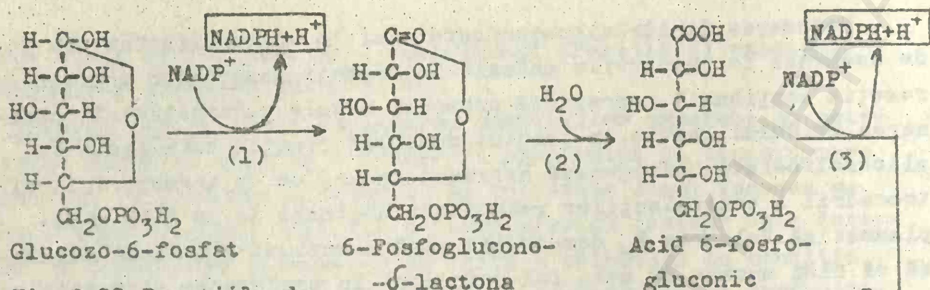
Formarea acidului malic este catalizată de malatdehidrogenaza decarboxilantă care la organismele superioare manifestă specificitate faţă de $NADP^+$. Acidul oxalilacetic se formează prin carboxilarea acidului piruvic sub acţiunea piruvatcarboxilazei, prezentă în mitocondriile ţesuturilor animale. Cele două reacţii joacă rol fiziologic deosebit în sinteza glucidelor.

8.2.5. Calea pentozofosfaţilor

Alături cu secvenţa EMP, în ţesuturile animalelor, plantelor şi în microorganisme există căi alternative de oxidare a glucozei la CO_2. Foarte importantă este calea în care participă pentozofosfaţii, numită calea pentozofosfaţilor, şuntul hexozomonofosfaţilor sau calea fosfogluconică oxidativă, care a fost elucidată de O.Warburg, F. Lipmann, F.Dickens, V.A.Engelhardt, B.Horecker, E.Racker. Toate enzimele acestei căi metabolice se descoperă în citosolul celulelor vii.

Calea pentozofosfaţilor poate fi divizată într-o fază oxidativă ireversibilă şi o fază neoxidativă reversibilă.

Faza oxidativă a căii pentozofosfaţilor începe cu dehidrogenarea glucozo-6-fosfatului la C-1, reacţia fiind catalizată de glucozo-6-fosfat-dehidrogenază. Această enzimă, larg răspîndită în diferite microorganisme, plante şi animale, are drept coenzimă $NADP^+$. Produşii reacţiei de dehidrogenare sînt lactona acidului 6-fosfogluconic(6-fosfoglucono-δ-lactona) şi NADPH(fig.8.22, reacţia 1). Glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza este inhibată de NADPH şi interme-



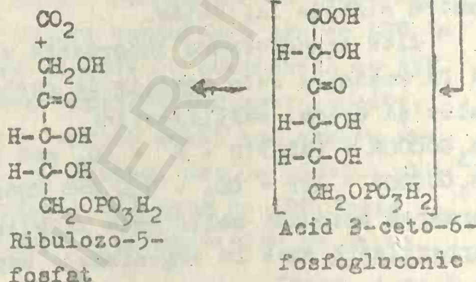
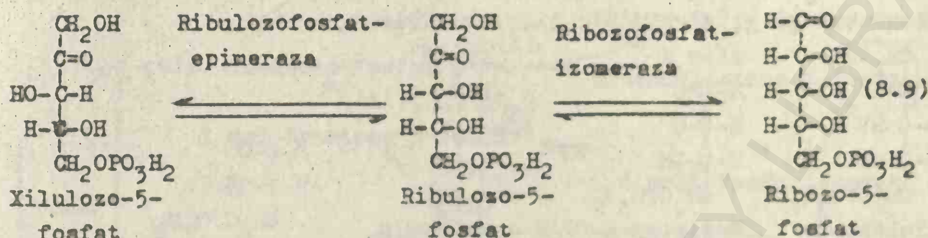


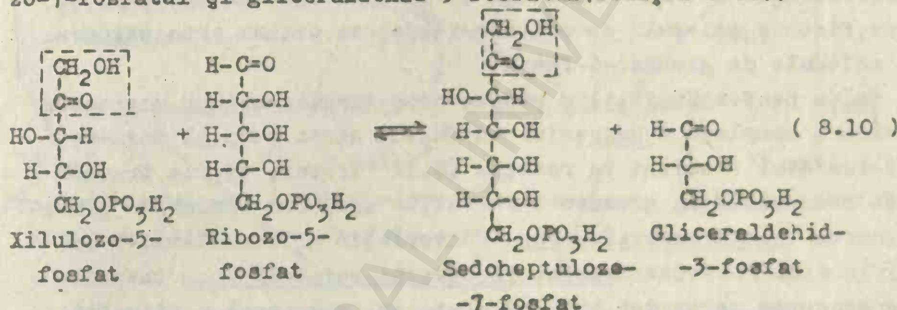
Fig.8.22.Reacţiile de dehidrogenare-decarboxilare ale căii pentozofosfaţilor,catalizate de glucozo-6-fosfat—dehidrogenază(1), gluconolactonază(2) şi 6-fosfogluconat—dehidrogenază(3).

diarii din biosinteza acizilor graşi.Enzima este un dimer şi derivaţii acil-CoA din biosinteza acizilor graşi accelerează disocierea ei în monomeri inactivi.Deficienţa ereditară a glucozo-6-fosfat—dehidrogenazei în eritrocite este asociată cu o formă grea de anemie.A doua etapă cuprinde hidroliza 6-fosfoglucono-lactonei de către gluconolactonază,cu formarea acidului 6-fosfo-gluconic.Reacţia (2) poate să decurgă spontan,însă viteza procesului este asigurată de gluconolactonază.Oxidarea ulterioară a acidului 6-fosfogluconic se realizează în prezenţa fosfogluconat-dehidrogenazei care este $NADP^+$ şi Mn^{2+}-dependentă.Se presupune că produsul intermediar în reacţia (3) ar fi acidul 3-ceto-6-fosfo-gluconic care nu se poate izola,întrucît se decarboxilează în momentul formării lui la suprafaţa enzimei,rezultînd ribulozo-5-fosfatul.

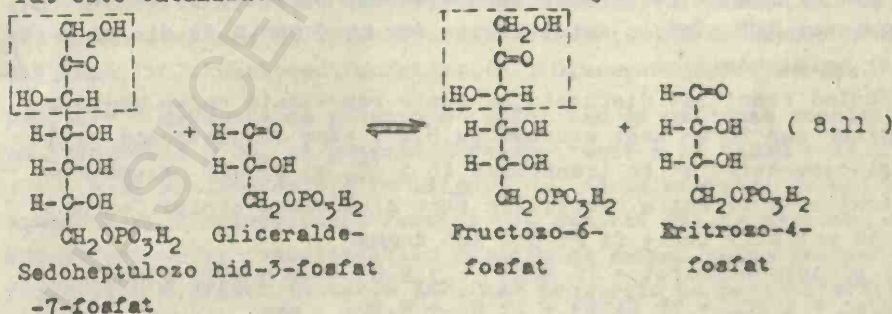
In faza neoxidativă a căii pentozofosfaţilor,ribulozo-5-fosfatul se izomerizează în ribozo-5-fosfat şi în xilulozo-5-fosfat, sub acţiunea ribozofosfatizomerazei şi respectiv ribulozofosfat-3-epimerazei(ecuaţia 8.9).In celula vie pentozofosfaţii nu se acumulează în cantităţi apreciabile.Ei sînt convertiţi în gliceraldehid-3-fosfat şi fructozo-6-fosfat.In aceste transformări sînt



implicate enzimele <u>transcetolaza</u> şi <u>transaldolaza</u>, care transferă un fragment de 2C şi respectiv 3C de la un cetozofosfat la un aldozofosfat. Transcetolaza, avînd drept coenzimă TPP, catalizează transferul atomilor de C 1şi 2 de la xilulozo-5-fosfat la ribozo-5-fosfat. Ca rezultat al acestei reacţii se formează sedoheptulozo-7-fosfatul şi gliceraldehid-3-fosfatul(ecuaţia 8.10).

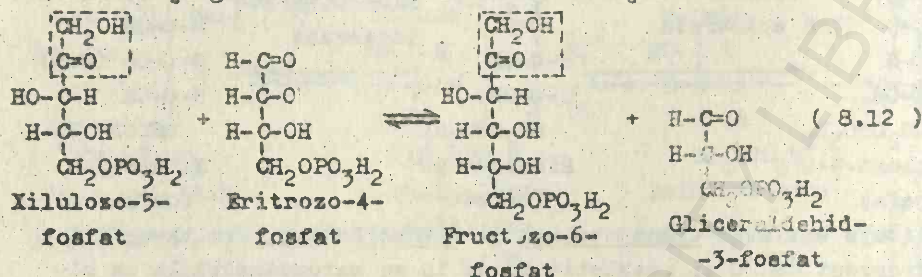


Sedoheptulozo-7-fosfatul reacţionează cu gliceraldehid-3-fosfatul, formînd fructozo-6-fosfatul şi eritrozo-4-fosfatul. Această sinteză a unui cetohexozofosfat şi a unui aldotetrozofosfat este catalizată de transaldolază(ecuaţia 8.11).



Sub acţiunea transcetolazei, care intervine pentru a doua oară în calea pentozofosfaţilor, eritrozo-4-fosfatul acceptă un

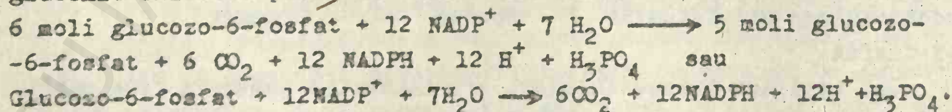
fragment C_2 de la xilulozo-5-fosfat şi se sintetizează fructozo-6-fosfatul şi gliceraldehid-3-fosfatul(ecuaţia 8.12).



Făcînd bilanţul reacţiilor catalizate de transcetolază şi transaldolază constatăm: 2 Xilulozo-5-fosfat + ribozo-5-fosfat ⇌ 2 Fructozo-6-fosfat + gliceraldehid-3-fosfat. Prin urmare pentozofosfaţii pot fi convertiţi în intermediari glicolitici şi invers. Fiecare moleculă de pentozo-fosfat se obţine prin oxidarea unei molecule de glucozo-6-fosfat.

Calea pentozofosfaţilor adesea este considerată ca un proces de oxidare completă a hexozelor în CO_2. In acest scop, gliceraldehid-3-fosfatul, rezultat în reacţia (8.12) trebuie să fie transformat reversibil în glucozo-6-fosfat, cu ajutorul enzimelor gluconeogenezei: triozofosfatizomeraza converteşte gliceraldehid-3-fosfatul în dihidroxiacetonfosfat; fructozodifosfataldolaza catalizează condensarea celor doi triozofosfaţi în fructozo-1,6-difosfat; fructozodifosfataza hidrolizează fructozo-1,6-difosfatul în fructozo-6-fosfat şi glucozofosfatizomeraza izomerizează fructozo-6-fosfatul în glucozo-6-fosfat, care din nou intră în şuntul hexozomonofosfaţilor. Insă gliceraldehid-3-fosfatul poate fi oxidat conform schemei EMP pînă la acid piruvic, iar mai departe în ciclul acizilor tricarboxilici.

Sumînd reacţiile discutate, se poate reprezenta calea pentozofosfaţilor sub forma unei scheme (fig.8.23) care demonstrează că 6 moli glucozo-6-fosfat se transformă în 6 CO_2 şi 5 moli hexozofosfat. Ecuaţia de bilanţ a reacţiilor care alcătuiesc ciclul fosfogluconic oxidativ poate fi redată sub forma:



6 moli glucozo-6-fosfat + 12 $NADP^+$ + 7 H_2O ⟶ 5 moli glucozo-6-fosfat + 6 CO_2 + 12 NADPH + 12 H^+ + H_3PO_4 sau

Glucozo-6-fosfat + 12$NADP^+$ + 7H_2O ⟶ 6CO_2 + 12NADPH + 12H^++H_3PO_4.

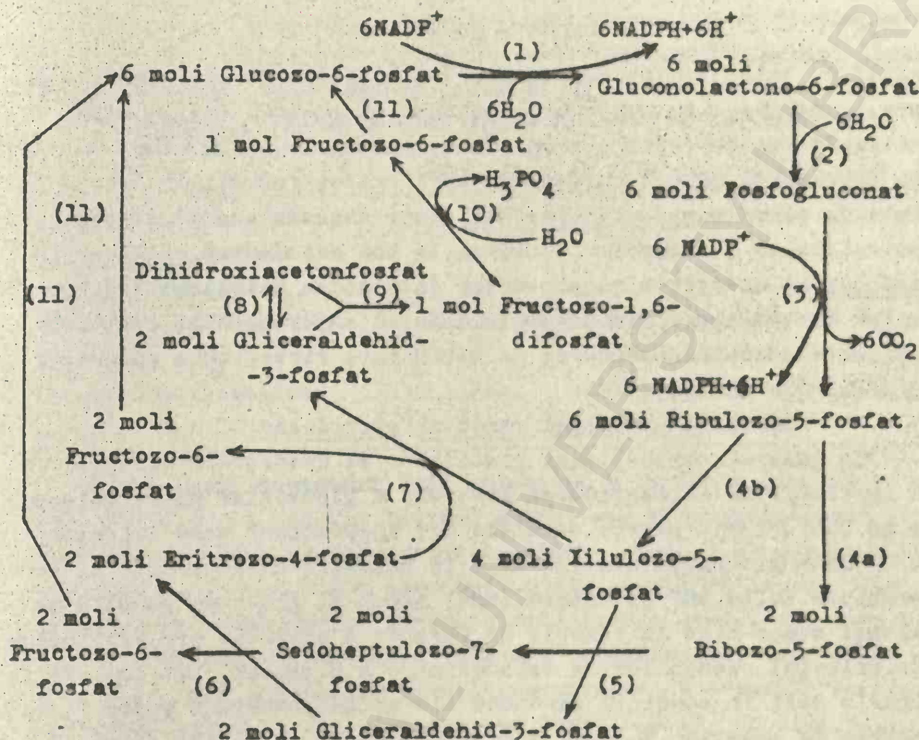


Fig.8.23.Schema reacţiilor implicate în calea pentozofosfaţilor.

(1): Glucozo-6-fosfat —dehidrogenaza; (2): Gluconolactonaza; (3): 6-fosfogluconat —dehidrogenaza; (4b): Ribulozofosfat-epimeraza; (4a): Ribozofosfat-izomeraza; (5): Transcetolaza; (6): Transaldolaza; (7): Transcetolaza; (8): Triozofosfatizomeraza; (9): Fructozodifosfat-aldolaza; (10): Fructozodifosfataza; (11): Glucozofosfatizomeraza.

Deci din 6 molecule de glucozo-6-fosfat una se oxidează complet, cu formarea a 6 CO_2 şi generarea concomitentă a 12 NADPH + 12 H^+.

Calea pentozofosfaţilor asigură obţinerea energiei la multe bacterii şi ciuperci.Unele reacţii ale acestei căi,de asemenea,au rol hotărîtor în fotosinteză.In organismul animal calea pentozofosfaţilor coexistă cu calea EMP,însă proporţia de participare la generarea de energie variază după funcţia organelor.Astfel în ficat 70-90% din glucozo-6-fosfat se scindează pe calea EMP,iar

restul pe calea pentozofosfaţilor. In cristalin, cornee, glandele mamare, leucocite, cortexul suprarenalelor şi ţesutul adipos calea pentozofosfaţilor este predominantă. Avantajele pe care le dobîndeşte organismul prin funcţionarea căii pentozofosfaţilor sînt multiple. De exemplu, ribozo-5-fosfatul este necesar pentru sinteza nucleotidelor şi acizilor nucleici. In mod asemănător, eritrozo-4-fosfatul se foloseşte ca precursor în sinteza aminoacizilor aromatici la plante şi microorganisme. Rolul major al căii pentozofosfaţilor constă în producerea de NADPH care serveşte ca reducător în procesele biosintetice.

8.2.6. Catabolismul aerob al glucidelor

In general catabolismul glucidelor se desfăşoară aerob, adică cu participarea O_2. Degradarea anaerobă a glucidelor apare mai mult ca un subterfugiu pentru celulele vii insuficient aprovizionate cu O_2. Insă glicoliza are loc atît în condiţii anaerobe cît şi în aerobioză. Calea EMP şi catabolismul aerob al glucozei parcurg aceleaşi etape pînă la reacţia de formare a acidului piruvic, inclusiv. Bilanţul reacţiilor de catabolizare a glucozei pînă la acid piruvic atît în condiţii anaerobe cît şi în aerobioză poate fi descris de ecuaţia: $C_6H_{12}O_6 + 2\ ADP + 2\ H_3PO_4 + 2\ NAD^+ \longrightarrow$ $\longrightarrow 2\ CH_3COCOOH + 2\ ATP + 2\ NADH + 2\ H^+$. In lipsa O_2, regenerarea NAD^+ din NADH se realizează prin reacţia de reducere a acidului piruvic sau a produşilor lui de transformare. Cînd celula vie este aprovizionată cu suficient O_2, NADH format în etapa oxidativă a glicolizei se reoxidează prin lanţul respirator, iar acidul piruvic se transformă în continuare pe diferite căi.

Pentru catabolismul aerob se observă eliberarea de CO_2 şi absorbţia de O_2. Raportul molar dintre CO_2 degajat şi O_2 consumat se numeşte coeficient respirator ($CR=CO_2/O_2$). Pentru toate glucidele CR=1. Valoarea medie a CR este de 0,70 pentru lipide şi 0,80 pentru proteine.

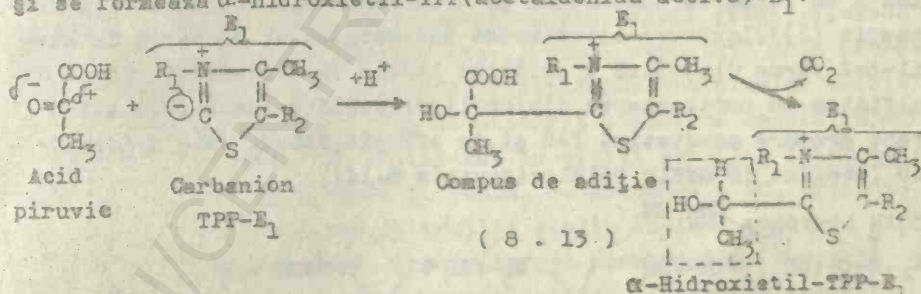
8.2.6.1. Decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic. In majoritatea celulelor animale şi vegetale, de asemenea, în microorganisme, acidul piruvic se transformă preponderent prin decarboxilare oxidativă în acetil-coenzimă A (acetil-CoA) şi CO_2. Decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic este catalizată de complexul multien-

zimatic numit piruvatdehidrogenază, care reprezintă o asociație de trei enzime (tabelul 8.2) ce folosesc 5 coenzime (TPP, acidul lipoic, CoA, FAD și NAD^+) și necesită prezența Mg^{2+}.

Tabelul 8.2. Enzimele componente ale piruvatdehidrogenazei

Enzima	Coenzima	Reacția catalizată
Piruvatdecarboxilaza (Component piruvat-dehidrogenaza) = E_1	TPP	Decarboxilarea acidului piruvic
Dihidrolipoiltrans-acetilaza = E_2	Acid lipoic	Oxidarea unității C_2 și transferul la CoA
Dihidrolipoildehidro-genaza = E_3	FAD	Regenerarea formei oxidate a lipoilamidei

Mecanismul decarboxilării oxidative a acidului piruvic se explică în felul următor. Inițial, acidul piruvic reacționează cu TPP legat cu componentul piruvatdehidrogenaza (E_1) al complexului multienzimatic. Trăsătura esențială a TPP constă în faptul că C dintre N și S din ciclul tiazolic este foarte acid. Acest atom de carbon ionizează, luînd astfel naștere un carbanion care se adiționează la >C=O a acidului piruvic, favorizînd decarboxilarea ultimului (ecuația 8.13). In urma acestei reacții (8.13) se degajă CO_2 și se formează α-hidroxietil-TPP (acetaldehidă activă)-E_1.



(8 . 13)

Grupa hidroxietil atașată la TPP-E_1 intră în reacție cu forma disulfidică a acidului lipoic; ultimul este unit printr-o legătură amidică cu grupa ε-NH_2 a restului de lizină din molecula dihidrolipoiltransacetilazei. In această reacție grupa hidroxietil este oxidată la acetil de către dihidrolipoiltransacetilază, rezultînd acidul S-acetildihidrolipoic, compus macroergic (fig.8.24,

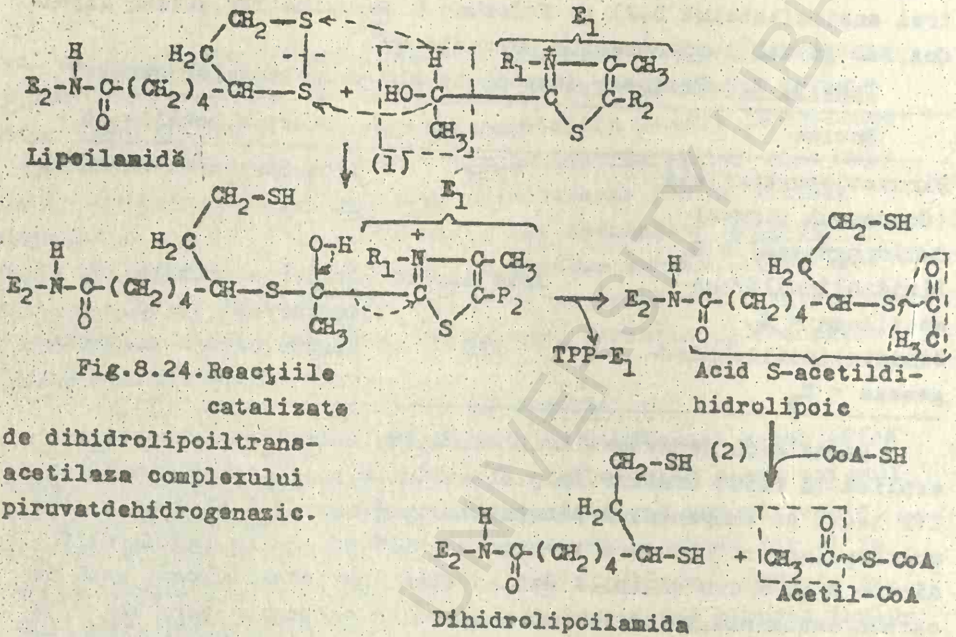
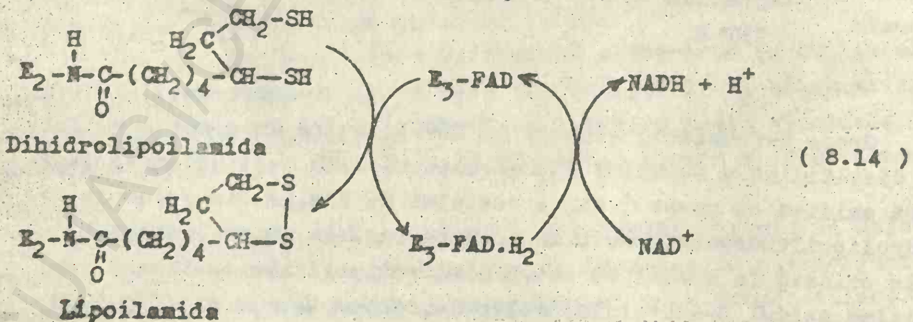


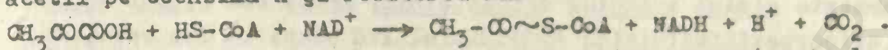
Fig.8.24. Reacţiile catalizate de dihidrolipoiltransacetilaza complexului piruvatdehidrogenazic.

reacţia (1)). Mai departe dihidrolipoiltransacetilaza catalizează transferul restului acetil de la acetildihidrolipoilamidă la coenzima A cu formarea acetil-CoA şi a acidului dihidrolipoic(fig.8.24, reacţia (2)). Legătura tioesterică macroergică se conservă în acetil-CoA. Forma ditiolică a acidului lipoic se oxidează în forma disulfidică cu participarea dihidrolipoildehidrogenazei(E_3), avînd drept grupare prostetică FAD şi, în sfîrşit, $FAD.H_2$ este oxidat de NAD^+ prezent în mediu celular(ecuaţia 8.14)



Ca rezultat al reacţiilor de mai sus a avut loc decarboxila-

rea oxidativă a acidului piruvic,cuplată cu fixarea radicalului acetil pe coenzima A şi reducerea NAD^+:



$$CH_3COCOOH + HS\text{-}CoA + NAD^+ \longrightarrow CH_3\text{-}CO\sim S\text{-}CoA + NADH + H^+ + CO_2 .$$

Complexul multienzimatic al piruvatdehidrogenazei este localizat în mitocondriile celulelor animale şi vegetale.

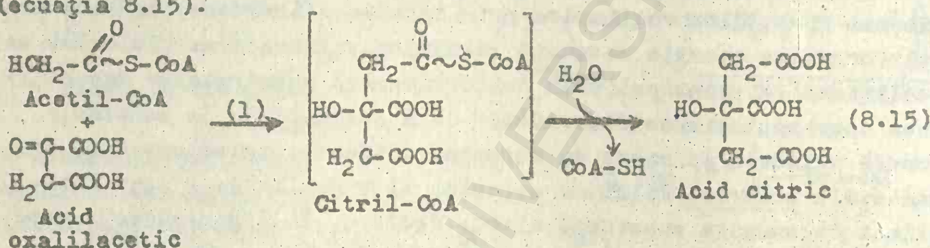
Acetil-CoA formată prin decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic poate participa în acetilarea colinei şi aminelor aromatice sau în biogeneza acizilor graşi şi steroidelor.Insă majoritatea acetil-CoA se oxidează complet pînă la CO_2 şi apă,cu sintetizarea ATP.

8.2.6.2.Oxidarea biologică.Oxidarea biologică cuprinde totalitatea reacţiilor enzimatice prin care se eliberează din substanţele organice energia necesară celulelor vii.Oxidarea biologică se realizează în principal prin dehidrogenarea substratelor sub acţiunea unor enzime specifice.Atomii de H scindaţi de la substanţa supusă oxidării se unesc cu acceptori diferiţi,reducîndu-i.La organismele anaerobe rolul de acceptor al atomilor de H este îndeplinit de anumite substanţe,altele decît O_2.In organismele aerobe acceptorul H este O_2,ceea ce conduce la formarea apei.Organismele facultativ anaerobe folosesc în calitate de acceptori ai H fie O_2, fie diferite substanţe organice,în funcţie de condiţiile mediului înconjurător.In celulele organismelor aerobe reacţiile oxidoreducătoare,generatoare de energie,se desfăşoară în trei stadii.In primul stadiu se formează acetil-CoA din substratele iniţiale ale oxidării biologice care sînt monoglucidele,acizii graşi,glicerolul,aminoacizii,bazele azotate etc.,produşi rezultaţi prin hidroliza poliglucidelor,oligoglucidelor,lipidelor,proteinelor,acizilor nucleici.Al doilea stadiu al oxidării biologice constă în oxidarea restului acetil al acetil-CoA în ciclul acizilor tricarboxilici,cu formarea NADH,NADPH şi $FAD\text{-}H_2$,de asemenea,a CO_2 prin decarboxilarea substratelor.Al treilea stadiu include oxidarea NADH şi $FAD.H_2$,adică transferul protonilor şi electronilor lor prin lanţul respirator la O_2,cu formarea apei şi eliberarea energiei care se acumulează predominant sub forma legăturilor macroergice ale ATP.O parte din energia eliberată se pierde sub formă de căldură.

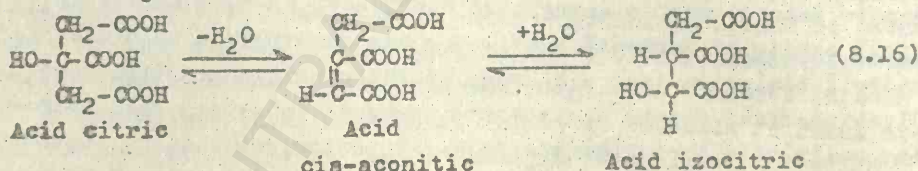
8.2.6.2.1.Ciclul acizilor tricarboxilici.Secvenţa de reacţii care asigură oxidarea completă a restului acetil activat la CO_2

se numeşte ciclul acidului citric,ciclul Krebs sau ciclul acizilor tricarboxilici(ciclul ATC).Ciclul ATC ocupă un loc esenţial în metabolismul substanţelor,deoarece reprezintă calea finală comună de oxidare a acetil-CoA rezultată prin catabolizarea monoglucidelor,acizilor graşi şi unor aminoacizi.Reacţiile ciclului ATC se desfăşoară în mitocondrii.

Prima etapă a ciclului ATC este condensarea aldolică a acidului oxalilacetic cu acetil-CoA,urmată de hidroliză,conducînd la acidul citric şi CoA,conform reacţiei,catalizată de citratsintază (ecuaţia 8.15).



Aconitathidrataza,catalizînd o reacţie de dehidratare şi o reacţie de adiţie a apei,izomerizează acidul citric în acid izocitric,cu formarea acidului cis-aconitic în calitate de intermediar(ecuaţia 8.16).In starea de echilibru conţinutul relativ al



celor trei acizi este de 90, 4 şi respectiv 6%.Oxidarea acidului izocitric în etapa următoare deplasează procesul în direcţia ciclului ATC.

Acidul izocitric se oxidează în acid α-cetoglutaric sub acţiunea izocitratdehidrogenazei(ICDH).Unele ţesuturi vii,de exemplu,ţesuturile animale conţin două ICDH: una specifică faţă de NAD^+,localizată în mitocondrii,prezintă importanţă pentru ciclul ATC;alta este $NADP^+$-dependentă şi se află atît în citosol(80%) cît şi în mitocondrii.După natura coenzimei,mecanismul de acţiune al ICDH se desfăşoară în una sau două faze,cînd apare ca intermediar acidul oxalilsuccinic,care rămînînd legat cu enzima,se decarboxilează uşor(fig.8.25).

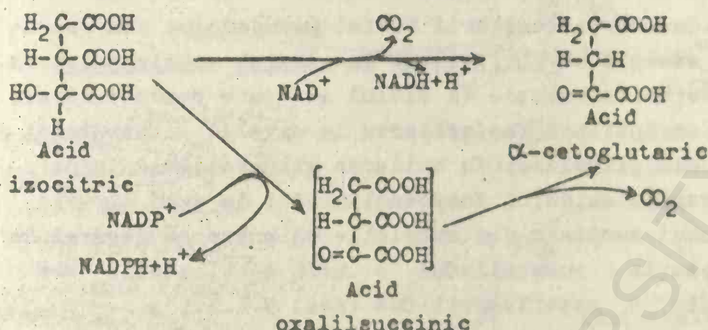
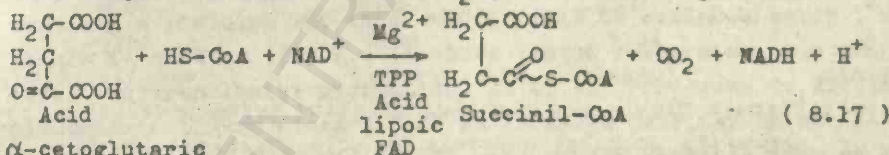


Fig.8.25. Mecanismul reacţiei catalizate de izocitratdehidrogenază.

In urma reacţiei descrise are loc prima dehidrogenare şi prima decarboxilare în ciclul ATC. Acidul α-cetoglutaric apare ca un punct de legătură între metabolismul glucidic sau lipidic şi metabolismul proteinic, în care acest acid rezultă prin dezaminarea acidului glutamic.

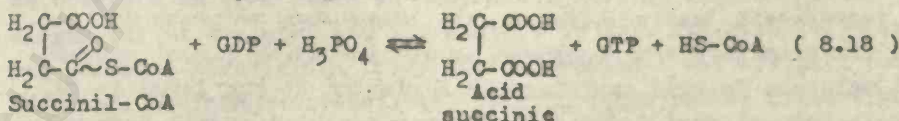
Următoarea etapă a ciclului ATC constă în decarboxilarea oxidativă a acidului α-cetoglutaric, proces realizat de α-cetoglutaratdehidrogenază(α-CGDH) după un mecanism analog cu cel descris la conversia acidului piruvic în acetil-CoA. Produşii finali în reacţia catalizată de α-CGDH(complex multienzimatic alcătuit din 3 componenţi) sînt succinil-CoA, CO_2 şi $NADH+H^+$(ecuaţia 8.17).



(8.17)

Reacţia 8.17 constituie a doua decarboxilare şi a doua dehidrogenare în ciclul ATC.

Succinil-CoA conţinînd legătura tioesterică macroergică poate să participe la sinteza porfirinelor. Insă pentru continuarea ciclului ATC are loc clivajul succinil-CoA cuplat cu fosforilarea GDP, conform reacţiei (8.18).



(8.18)

Această reacţie uşor reversibilă este catalizată de succinil-CoA sintetază(succinattiokinază). In prezenţa nucleoziddifosfatkinazei,

GTP transferă restul fosforil terminal la ADP : GTP + ADP ⇌ ⇌ GDP + ATP. Generarea legăturii fosfat macroergice din succinil-CoA este un exemplu de fosforilare la nivelul substratului. De fapt, aceasta este unica reacţie în ciclul ATC care conduce direct la formarea ATP. Am întîlnit fosforilarea la nivelul substratului în două reacţii ale glicolizei: în oxidarea gliceraldehid-3-fosfatului şi în conversia acidului fosfoenolpiruvic la acid piruvic. Eliberarea acidului succinic din succinil-CoA poate să decurgă, de asemenea, după reacţia : succinil-CoA + acid acetilacetic ⇌ ⇌ acid succinic + acetilacetil-CoA (vezi 9.1.1.5).

Pentru încheierea ciclului ATC, acidul succinic este transformat în acid oxalilacetic (fig. 8.26). Acidul succinic este oxidat în acid fumaric de către succinatdehidrogenază (SDH), care conţine 4 atomi de Fe neheminic şi FAD ataşat covalent cu un rest de histidină din molecula apoenzimei. Spre deosebire de celelalte enzime ale ciclului ATC, SDH se găseşte fixată în membrana mitocondrială internă. Scindarea H de la acidul succinic este cea de a treia dehidrogenare în ciclul ATC.

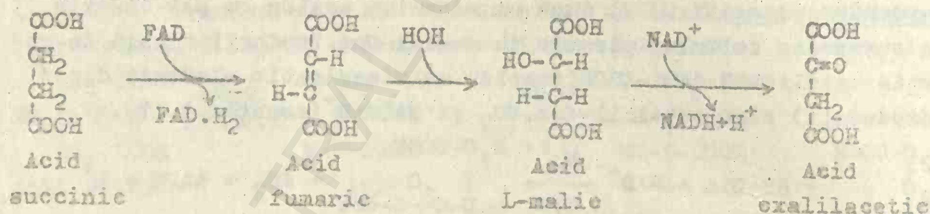


Fig. 8.26. Etapele finale ale ciclului acizilor tricarboxilici: conversia acidului succinic în acid oxalilacetic.

In următoarea etapă a ciclului ATC fumarathidrataza catalizează adiţionarea trans-stereospecifică a -H şi -OH apei la acidul fumaric cu formarea acidului L-malic.

In ultima etapă, malatdehidrogenaza, avînd drept coenzimă NAD^+, oxidează acidul malic la acid oxalilacetic. Prin parcurgerea unui tur complet al ciclului (fig. 8.27), molecula de acid oxalilacetic se regenerează. Insă, aceasta nu este întrutotul molecula de acid oxalilacetic care s-a condensat cu acetil-CoA. In timpul procesului, molecula de acid oxalilacetic a pierdut 2C sub formă de CO_2, completîndu-şi apoi deficitul pe seama restului acetil. Noua mole-

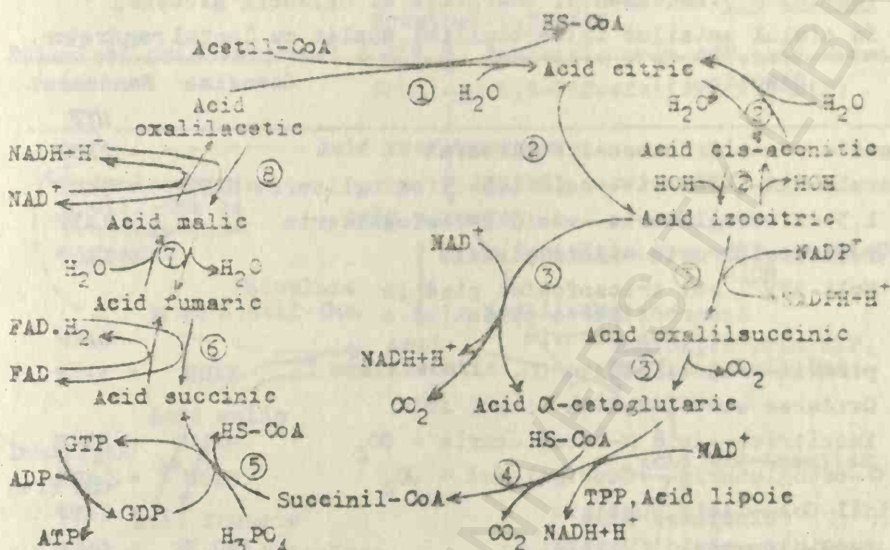


Fig.8.27.Schema ciclului acizilor tricarboxilici

culă de acid oxalilacetic poate acum să se condenseze cu o altă moleculă de acetil-CoA şi ciclul se repetă.Reiese că cele 2 CO_2 care se scindează în fiecare tur al ciclului,se formează prin oxidarea atomilor de C din restul acetil al acetil-CoA.Funcţionarea continuă a ciclului ATC este condiţionată de oxidarea celor 3 molecule de NADH şi ($FAD.H_2$) de către lanţul respirator,prin transferul electronilor(şi protonilor) la O_2,cu producerea de ATP.In mitocondrii pentru fiecare NADH se formează 3ATP,iar un mol de $FAD.H_2$ generează 2ATP.Ciclul ATC este strict aerob,în timp ce glicoliza se poate desfăşura în condiţii anaerobe şi aerobe.

Un calcul matematic simplu demonstrează că prin oxidarea restului acetil în ciclul Krebs se sintetizează 12 moli ATP(tabelul 8.3).Dacă la aceştia se adaugă 3ATP rezultaţi prin oxidarea NADH format. în reacţia de decarboxilare oxidativă a acidului piruvic, se constată că prin oxidarea completă a acestui compus într-un singur tur al ciclului ATC iau naştere 15 moli ATP.Pînă la formarea acidului piruvic din triozofosfat rezultă 1 mol ATP şi 1 mol NADH,deci se înmagazinează 1+1x3=4ATP.In total,pentru fiecare mol de triozofosfat se sintetizează 4+15=19ATP.Prin urmare,catabolizarea aerobă a unui mol de glucoză este asociată cu sintetizarea

Tabelul 8.3. Randamentul energetic al oxidării glucozei în ciclul acizilor tricarboxilici, cuplat cu lanţul respirator.

Reacţia	Coenzima	Randament ATP
Glucoza - - → Fructozo-1,6-difosfat		- 2ATP
Gliceraldehid-3-fosfat → Acid 1,3-difosfogliceric	NADH	+ 3ATP
Acid 1,3-difosfogliceric → Acid 3-fosfogliceric		+ 1ATP
Acid fosfoenolpiruvic → Acid piruvic		+ 1ATP
Moli ATP/1 mol triozofosfat pînă la decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic		4ATP
Acid piruvic → acetil-CoA + CO_2	NADH	+ 3ATP
Oxidarea acetil-CoA în ciclul ATC :		
Acid izocitric → Acid α-cetoglutaric + CO_2	NADH	+ 3ATP
Acid α-cetoglutaric → Succinil-CoA + CO_2	NADH	+ 3ATP
Succinil-CoA → Acid succinic		+ 1ATP
Acid succinic → Acid fumaric	$FAD.H_2$	+ 2ATP
Acid malic → Acid oxalilacetic	NADH	+ 3ATP
Moli ATP/1 mol acetil-CoA		12ATP
Moli ATP/1 mol acid piruvic		15ATP
Total moli ATP/1 mol triozofosfat		19ATP

a 2x19=38 moli ATP, în timp ce glicoliza anaerobă dă numai 2 moli ATP. Unii intermediari ai ciclului ATC se folosesc în diferite biosinteze.

8.2.6.2.2. Reglarea glicolizei şi ciclului acizilor tricarboxilici. Reglarea acestor căi metabolice trebuie să asigure cantitatea de ATP echivalentă cu cerinţele energetice ale celulei la un moment dat. In funcţie de condiţiile fiziologice există diferite mecanisme care controlează viteza glicolizei şi ciclului ATC (fig. 8.28). De exemplu, acetil-CoA serveşte ca efector pozitiv pentru transformarea acidului piruvic în acid oxalilacetic (vezi 8.2.4). Deci, acetil-CoA cuplează procesul de formare a intermediarului necesar pentru metabolizarea ei proprie. In lipsa acidului piruvic, funcţionarea ciclului ATC poate să se frîneze din cauza insuficienţei acidului oxalilacetic. O asemenea situaţie se observă în metabolizarea acizilor graşi, cînd are loc dereglarea meta-

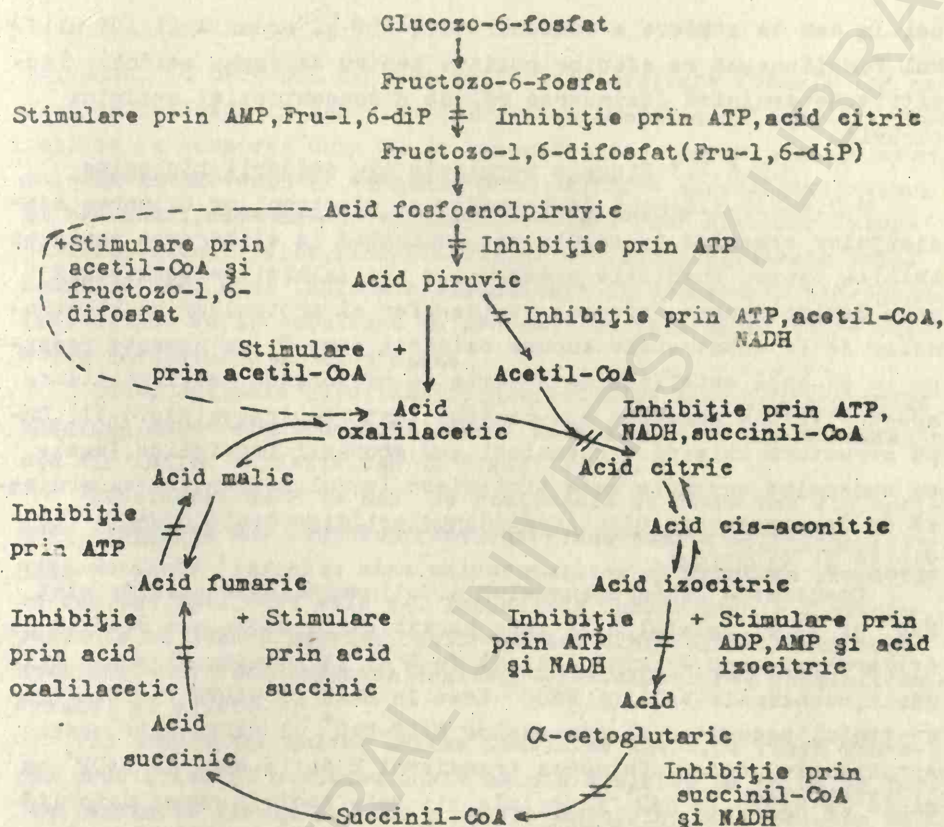


Fig.8.28. Schema reglării glicolizei şi ciclului acizilor tricarboxilici.

bolismului glucidic, de exemplu, în diabetul zaharat.

Viteza etapelor oxidative ale ciclului ATC este determinată de viteza de reoxidare a NADH în lanţul respirator. ATP prezent în concentraţii mari în celulă acţionează după principiul feedback inhibînd procesele de catabolizare a glucidelor şi acilglicerolilor. Această inhibiţie se realizează la nivelul multor etape din cele două căi, unele fiind indicate în fig.8.28.

Al doilea semnal care informează celula despre viteza prea mare a proceselor catabolice este cantitatea de acid citric acumulată în mitocondrii. Acidul citric acţionează ca efector negativ al fosfofructokinazei şi astfel scade viteza generală a glicoli-

zei. In caz de scădere a concentraţiei ATP şi acumulării ADP, ultimul funcţionează ca efector pozitiv pentru oxidarea acidului izocitric, determinînd diminuarea rapidă a concentraţiei acidului piruvic.

8.2.6.2.3. Etapele terminale ale oxidării biologice

8.2.6.2.3.1. Lanţul de transfer al electronilor. Oxidarea substanţelor organice în celula vie, conducînd la eliberarea energiei chimice pentru funcţiile endergonice ale celulei, se realizează prin dehidrogenare. Procesul de transfer al protonilor şi electronilor de la substratele supuse oxidării spre O_2 se numeşte respiraţie şi este catalizat de o serie de oxidoreductaze. Totalitatea acestor enzime formează aşa-numitul lanţ respirator (fig. 8.31). După structura chimică a coenzimei sau grupării prostetice, legate cu apoenzima, enzimele care alcătuiesc lanţul respirator se grupează în dehidrogenaze nicotinamiddinucleotidice, dehidrogenaze flavinice şi citocromi.

Coenzimele dehidrogenazelor nicotinamiddinucleotidice sînt NAD^+ şi $NADP^+$ (tabelul 6.1) care participă în numeroase reacţii de oxidare-reducere. Primind 2 atomi de H de la substratul supus oxidării, coenzimele NAD^+ şi $NADP^+$ trec în NADH şi NADPH (fig. 6.1). Potenţialul reducător al sistemelor NADH-NAD^+ şi NADPH-$NADP^+$ este aproximativ acelaşi. De aceea transferul H de la NADH la $NADP^+$ ca şi de la NADPH la NAD^+ în celula vie este posibil numai datorită NAD(P)-transhidrogenazei: $NADH + NADP^+ \rightleftharpoons NAD^+ + NADPH$. Se cunosc peste 150 de dehidrogenaze NAD^+- şi $NADP^+$-dependente. Majoritatea dehidrogenazelor nicotinamiddinucleotidice sînt strict specifice în raport cu NAD^+ şi $NADP^+$. Unele din ele manifestă o specificitate mai slabă faţă de coenzimă, ca de exemplu, glutamatdehidrogenaza care poate folosi atît NAD^+ cît şi $NADP^+$. Legătura între forma oxidată sau redusă a NAD şi NADP şi apoenzimă se realizează şi se scindează reversibil în cursul procesului catalitic. Disocierea complecşilor coenzimă-apoenzimă poate avea loc într-o măsură mai mare sau mai mică aproape pentru toate dehidrogenazele nicotinamiddinucleotidice. O excepţie constituie gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza, în care apoenzima se uneşte cu NAD prin legătură covalentă. In celula vie NAD se găseşte preponderent în mitocondrii, iar NADP în citosol. Dehidrogenazele NAD-dependente participă în

principal la procesul de respirație tisulară, unde formele lor reduse se oxidează în lanțul respirator, transferînd electronii captați de la substrat spre O_2 cu generarea de energie care se acumulează în ATP. NADH se formează prin oxidarea alcoolilor primari și secundari, aldehidelor, aminoacizilor, aminelor, acizilor dicarboxilici, cetoacizilor, hidroxiacizilor etc. Dehidrogenazele avînd coenzimă NADP sînt implicate predominant în transferul hidrogenului, obținut de la substrate în procesul de catabolism, către reacțiile reducătoare de biosinteză.

Toate enzimele nicotinamiddinucleotidice sînt dehidrogenaze anaerobe, adică ele transferă atomii de H la o altă enzimă apropiată din lanțul oxidativ, dar nu direct la O_2.

Reoxidarea NADH la NAD^+ se realizează de către una din enzimele flavinice ale lanțului respirator, așa-numita NADH-dehidrogenază. Enzimele flavinice sînt oxidoreductaze cu gruparea prostetică FAD sau FMN. Intre cele mai importante dehidrogenaze flavindependente se numără succinatdehidrogenaza, dihidrolipoildehidrogenaza, acil-CoA dehidrogenaza, α-glicerolfosfatdehidrogenaza (mitocondrială) și altele.

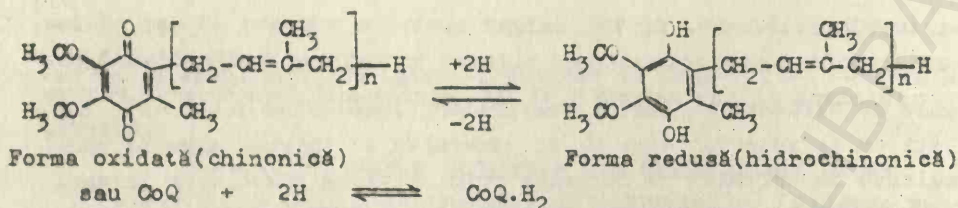
In compoziția multor enzime flavinice intră, pe lîngă gruparea prostetică, de asemenea, unele metale grele (Fe, Cu, Mo, Co, Mg, Zn). Deci enzimele flavinice sînt metalflavoproteine. Se presupune că prezența metalului face posibilă trecerea de la sistemele transportoare de 2 electroni (sau transportoare de H) la cele transportoare de un electron (citocromi). In plus, metalul mediază legarea grupării prostetice cu apoenzima metalflavoproteinelor.

Flavinenzimele reduse transferă mai departe electronii spre sistemul citocromilor. Intre enzimele flavinice și citocromii lanțului respirator se pot intercala proteine, conținînd atomi de Fe neheminic legați cu resturile de cisteină (fiersulfproteine) și ubichinona sau coenzima Q (CoQ), capabile să existe în formele oxidată și redusă.

Primind 2H($2H^+ + 2e^-$) de la enzima flavinică redusă, coenzima Q se reduce reversibil conform reacției de mai jos (fig. 8.29).

De la coenzima Q electronii sînt transferați către sistemul citocromic al lanțului respirator, iar protonii trec în mediu.

Sistemul citocromic se compune dintr-un set de proteine



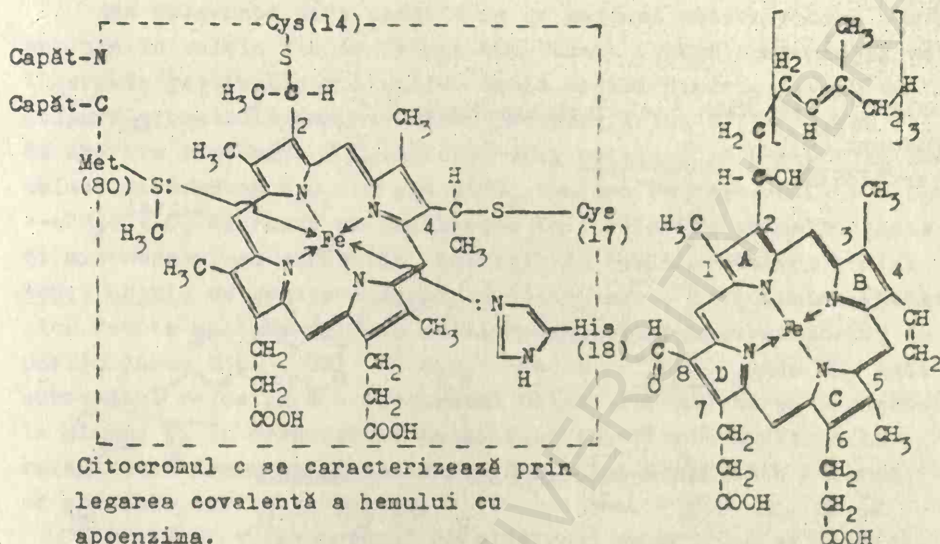
Forma oxidată(chinonică) Forma redusă(hidrochinonică)

sau CoQ + 2H ⇌ $CoQ.H_2$

Fig.8.29.Formele oxidată şi redusă ale coenzimei Q.

In cazul CoQ din mitocondriile mamiferelor n=10.

transportoare de electroni numite <u>citocromi</u> şi avînd drept grupare prostetică diferite fieroporfirine.In celulele organismelor superioare citocromii sînt răspîndiţi de-a lungul suprafeţei interne a membranei mitocondriilor.Fiecare citocrom individual se denumeşte printr-o literă a alfabetului a,b,c,la care se adaugă indexul corespunzător c ordine,de exemplu a_1,a_2,a_3,iar clasa citocromului se precizează prin literele A,B,C etc.Apartenenţa unui citocrom la o clasă determinată este dictată de structura grupării prostetice,individualitatea finală - de structura apoenzimei.In mitocondriile celulelor de animale şi plante superioare au fost identificaţi cel puţin cinci citocromi diferiţi: b,c,c_1,a şi a_3.In reticulul endoplasmatic s-a descoperit încă un tip de citocrom - b_5.Dintre citocromii cunoscuţi,cel mai bine studiat este citocromul c(cit.c).Acesta,spre deosebire de ceilalţi citocromi,se extrage din mitocondrii cu solvenţi apoşi.Citocromul c al mamiferelor conţine un singur lanţ polipeptidic,cuprinzînd 104 resturi de aminoacizi(masa moleculară 12.400 D),cu care se leagă covalent restul de fieroprotoporfirină IX sau hem(fig.8.30).Aceeaşi grupare prostetică se găseşte şi în citocromii b şi c_1.In citocromul c şi c_1 hemul se leagă covalent cu apoproteina(fig.8.30),iar în citocromul b hemul se ataşează necovalent la proteină.Citocromii a şi a_3 au o grupare prostetică fieroporfirinică diferită,numită <u>hem A</u>(fig.8.30),care se leagă necovalent cu apoenzima.Capacitatea citocromilor de a transporta electroni este condiţionată de schimbarea reversibilă a valenţei ionului de fier din gruparea prostetică.Prin oxidarea citocromului,fierul devine trivalent,iar prin reducere bivalent : $Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + e^-$.Gruparea prostetică a citocromilor poate transporta un singur electron.In lanţul respirator,citocromii,ca şi ceilalţi componenţi sînt dispuşi în ordinea



Citocromul c se caracterizează prin legarea covalentă a hemului cu apoenzima.

Fig.8.30.Structura citocromului c şi hemului A.

creşterii potenţialului lor de reducere.Ei sînt reduşi succesiv de componentul cu potenţialul cel mai coborît şi oxidaţi de componentul cu un potenţial mai ridicat.De la coenzima Q primeşte electronii citocromul b care trece în forma redusă.Citocromul b redus cedează electronii citocromului c_1,iar acesta îi transferă spre citocromul c,de la care ajung la complexul citocromilor a şi a_3,numit adesea <u>citocromoxidază</u>.In compoziţia acestui complex intră,deasemenea,doi atomi de cupru,care participă la transferul de electroni.Citocromul a_3 redus,spre deosebire de ceilalţi citocromi,are capacitatea de a reduce uşor O_2 căruia îi transmite electronii transferaţi prin lanţul respirator.Oxigenul molecular,primind electroni de la citocromul a_3,se transformă în ionul de oxigen : $\frac{1}{2}O_2 + 2e^- \rightleftharpoons O^{2-}$ .Anionul O^{2-} format reacţionează imediat cu $2H^+$ din mediu,rezultînd astfel molecula de apă: $2H^+ + O^{2-} \longrightarrow H_2O$ .Sumînd cele discutate,putem conchide că transferul electronilor de la substratul supus oxidării spre O_2 în mitocondrii se realizează conform schemei următoare(fig.8.31).

In precizarea succesiunii transportorilor în lanţul respira-

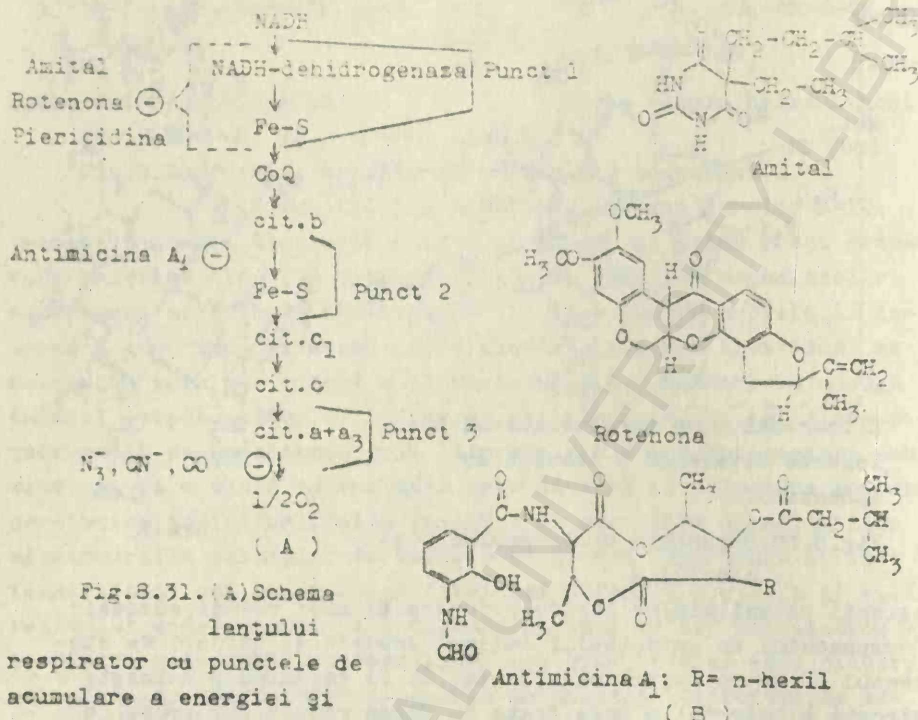


Fig.8.31. (A)Schema lanţului respirator cu punctele de acumulare a energiei şi locul de acţiune al unor inhibitori ai transportului de electroni; (B)Structura unor inhibitori ai transportului de electroni în lanţul respirator.

tor au jucat un rol important inhibitorii respiraţiei celulare(unii sînt indicaţi în fig.8.31).

Capacitatea citocromului a_3 de a interacţiona cu O_2 poate fi blocată prin adăugarea de cianură,care reacţionînd cu Fe^{3+} din gruparea prostetică a acestui citocrom,exclude transferul electronilor spre O_2.Insă,absorbţia O_2 de către ţesuturi se observă, într-o anumită măsură,chiar în prezenţa cianurii.Aceasta este aşa-numita respiraţie cianrezistentă.Ea se datoreşte unor enzime flavinice,ale căror forme reduse pot reacţiona cu O_2.Ca rezultat al acţiunii acestor dehidrogenaze aerobe(oxidaze),hidrogenul substratului supus oxidării este transferat direct la O_2,cu formarea H_2O_2.Ca exemple de asemenea oxidaze amintim glucozoxidaza,aminoacid-oxidazele,aminoxidazele etc.

Apa oxigenată,care constituie un oxidant puternic,dacă s-ar acumula în celula vie ar deveni dăunătoare pentru componenţii celulari.In ţesuturile vii există unele enzime heminice/avînd ca grupare prostetică hemina - fieriprotoporfirina IX(Fe^{3+})/,cu rol de apărare împotriva H_2O_2.Acestea sînt catalaza şi peroxidaza.Catalaza descompune H_2O_2 în apă şi O_2 conform reacţiei: $H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$.Catalaza se întîlneşte în ţesuturile animale,plante şi microorganisme aerobe.La indivizii cu boala ereditară numită acatalazemie se constată lipsa catalazei sau o activitate catalazică foarte mică.Peroxidaza catalizează oxidarea substratelor cu participarea H_2O_2 : $SH_2 + H_2O_2 \longrightarrow S + 2H_2O$,unde SH_2 este substratul redus şi S - substratul oxidat.Peroxidaza se găseşte în plante şi în organismele animalelor superioare.Enzimele care catalizează formarea şi scindarea H_2O_2 sînt localizate în organite speciale,numite peroxisomi.

In timpul transportului de electroni spre O_2,ca şi în diferite reacţii de hidroxilare şi oxigenare,apare un produs mai toxic decît H_2O_2.Acest important produs toxic este radicalul superoxid (O_2^-) care ia naştere prin reducerea monovalentă a oxigenului de către flavinele,chinonele şi alte combinaţii transportoare reduse.Toate organismele aerobe,de asemenea microorganismele facultativ aerobe posedă o enzimă,superoxid-dismutaza care catalizează reacţia : $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$ .Superoxid-dismutaza din bacterii şi din mitocondriile celulelor eucariote conţine Mn^{2+},iar superoxid-dismutaza din citoplasmă are în compoziţia sa Cu^{2+} sau Zn^{2+}.

H_2O_2 produs de superoxid-dismutază,ca şi cel format de oxidazele flavin-dependente,este descompus de catalază şi peroxidază.

Fosforilarea oxidativă.Transferul protonilor şi electronilor prin lanţul respirator spre O_2 are loc cu o scădere mare a energiei libere,care parţial se pierde sub formă de căldură,parţial se acumulează în legăturile chimice macroergice ale ATP. Sinteza ATP din ADP şi acid fosforic cu ajutorul energiei procesului de oxidare biologică se numeşte fosforilare oxidativă(oxidare fosforilantă).Se poate arăta că oxidarea unui mol de NADH de către un atom de oxigen,conducînd la formarea unui mol de H_2O,este

însoţită de eliberarea unei energii de -219KJ.Această valoare depăşeşte cu mult valoarea energiei libere de formare a ATP din ADP şi fosfat,egală cu +30,5 $KJ.mol^{-1}$(8,8 Kcal/mol).Rezultă că energia eliberată prin oxidarea NADH este suficient de mare pentru a asigura formarea cîtorva molecule de ATP în condiţiile conjugării fosforilării ADP cu procesul oxidativ în lanţul respirator.Pentru aprecierea capacităţii de fosforilare a lanţului respirator se utilizează raportul P/O egal cu numărul moleculelor de ATP formate la un atom de oxigen.Raportul P/O,denumit coeficient de fosforilare depinde de natura substratului supus oxidării.Dacă se oxidează NADH cu un atom de oxigen se formează trei molecule de ATP, deci raportul P/O($P/2e^-$)=3.Pentru oxidarea $FAD.H_2$ raportul P/O=2. Prin oxidarea citocromului c redus P/O=1.Cercetările au arătat că în lanţul respirator există 3 puncte(situsuri) în care se formează ATP prin fosforilarea ADP.Una din moleculele de ATP se sintetizează în timpul transferului perechii de electroni de la NADH la coenzima Q(situs 1).A doua fosforilare a ADP este localizată între citocromii b şi c.In sfîrşit,a treia moleculă de ATP este sintetizată în situsul 3 dintre citocromul c şi O_2(fig.8.31). In alte fragmente ale lanţului respirator scăderea energiei libere nu este atît de evidentă şi nu poate asigura formarea moleculei de ATP.Deci,lanţul respirator are structură de tip cascadă care permite eliberarea treptată a energiei libere pentru funcţiile endergonice ale celulei.Intrucît transferul a $2H^+$ şi $2e^-$ de la NADH la oxigen este însoţit de eliberarea unei energii de circa -219 KJ,iar formarea a 3 ATP are loc cu o schimbare a energiei libere de -91,5 KJ,înseamnă că eficacitatea acumulării energiei în oxidarea biologică va fi de aproximativ 40%.

Mecanismul fosforilării oxidative.Formarea ATP în toate cele trei situsuri de fosforilare ale lanţului respirator reprezintă un proces enzimatic cu mai multe etape catalizate de enzime specifice,localizate în mitocondrii.Fosforilarea ADP în ATP constituie etapa terminală a fosforilării oxidative.Pentru explicarea mecanismului fosforilării oxidative au fost propuse trei ipoteze: ipoteza cuplării chimice,ipoteza cuplării conformaţionale şi ipoteza chemiosmotică.

Ipoteza cuplării chimice a fosforilării oxidative presupune

că energia chimică,generată de transferul electronilor în lanţul respirator,este convertită în ATP pe calea unor reacţii succesive, cuprinzînd unii produşi intermediari macroergici comuni.Un model chimic ipotetic al fosforilării oxidative este redat în fig.8.32.

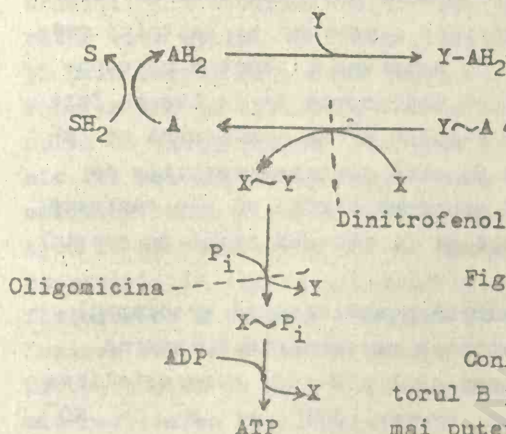


Fig.8.32.Ipoteza cuplării chimice

Conform acestei scheme,transportorul B posedă proprietăţi oxidante mai puternice decît transportorul A, iar transportorul A are capacitatea chimică deosebită de a reacţiona în starea redusă cu substanţa Y,formînd complexul Y-AH_2. Acest aduct neidentificat este oxidat de transportorul B în compusul macroergic Y~A.Cu derivatul macroergic Y~A reacţionează o altă combinaţie chimică X,formîndu-se complexul intermediar macroergic X~Y.In etapa următoare se activează fosfatul anorganic,cînd ia naştere X~P_i şi se eliberează intermediarul Y.In final,are loc transferul fosfatului macroergic la ADP,rezultînd ATP şi X liber.Prin urmare,X~Y îndeplineşte rolul de intermediar între transportorii de electroni şi enzimele implicate în sinteza ATP.

Ipoteza cuplării conformaţionale a fosforilării oxidative admite că energia eliberată în lanţul respirator este mai întîi folosită pentru trecerea enzimelor din membrana mitocondrială internă într-o stare conformaţională activă.Revenirea acestor componenţi ai lanţului respirator din starea înalt energizantă la starea normală ar asigura formarea compusului macroergic implicat în sinteza ATP.

Teoria chemiosmotică a fosforilării oxidative a fost elaborată de P.Mitchell în 1961.Această teorie se bazează pe conside-

rentul că transportul electronilor prin lanţul respirator crează un gradient electrochimic al ionilor H^{+}, în direcţia perpendiculară pe membrana mitocondrială internă, generînd energia necesară pentru sinteza ATP. Conform ipotezei chemiosmotice membrana internă este impermeabilă pentru H^{+}. Transportorii de electroni ai lanţului respirator sînt localizaţi vectorial în membrana internă a mitocondriei, astfel că reacţiile în care se utilizează H^{+} au loc pe faţa interioară, iar reacţiile din care rezultă H^{+} se desfăşoară pe faţa exterioară a membranei interne. Cu alte cuvinte, reacţiile de oxido-reducere sînt organizate în membrană astfel că ele captează H^{+} numai din matricea mitocondrială şi îi cedează numai în spaţiul intermembranar.

Mai departe ipoteza chemiosmotică postulează că gradientul electrochimic al ionilor H^{+} pe membrana mitocondrială internă constituie forţa motrice pentru complexul ATP-azic care catalizează sinteza ATP: ADP + H_3PO_4 $\longrightarrow$ ATP + H^{+} + HO^{-}. Ionii H^{+} şi HO^{-}, rezultaţi la formarea ATP, sînt translocaţi în direcţii opuse de gradientul electrochimic: ionii H^{+} sînt pompaţi în matrice, atraşi de excesul HO^{-}, iar ionii HO^{-} - în spaţiul intermembranar, atraşi de excesul H^{+}; în ambele cazuri se formează H_2O. Există presupunerea că sensul opus de mişcare a ionilor menţionaţi este favorizat de structura centrului activ al ATP-azei, care probabil are un caracter vectorial, eliberînd H^{+} în direcţia matricei, iar HO^{-} - în direcţia spaţiului intermembranar. ATP, care se formează în acest proces, este eliberat în matrice.

Cu toate că ipoteza chemiosmotică este susţinută de numeroase dovezi experimentale, împotriva ei s-au adus şi unele obiecţii. Una din ele a fost aceea că pentru sinteza unui mol de ATP din ADP ar fi necesar un gradient de H^{+} prin membrană de 3,5 unităţi de pH. După Mitchell nu tot gradientul electrochimic necesar trebuie să se manifeste ca o mare diferenţă de pH prin membrană; o parte din gradient poate să genereze un potenţial electric transmembranar. Acest potenţial transmembranar de aproximativ 0,15 V şi un gradient electrochimic de 1,5 unităţi de pH (acid la exterior) ar putea furniza energia folosită de ATP-ază pentru fosforilarea ADP în ATP.

Ipoteza cuplării chemiosmotice pare să fie cel mai aproape

de mecanismul real al fosforilării oxidative,putînd explica şi şi fotofosforilarea în cloroplaste şi în bacteriile fotosintetizante.

Reglarea respiraţiei şi inhibitorii fosforilării oxidative.In condiţii fiziologice,transportul electronilor prin lanţul respirator este cuplat cu fosforilarea.Electronii nu pot fi transferaţi prin lanţul respirator spre O_2 dacă nu are loc simultan fosforilarea ADP în ATP.Fosforilarea oxidativă reclamă NADH(sau altă sursă de electroni cu potenţial ridicat),O_2,ADP şi fosfat anorganic.Cel mai importamt factor care determină viteza fosforilării oxidative este nivelul ADP.Reglarea vitezei de fosforilare oxidativă de către nivelul ADP se numeşte control respirator.El este caracteristic pentru mitocondriile intacte,normale.Semnificaţia fiziologică a acestui mecanism de reglare este evidentă.Prin folosirea ATP în diferite procese celulare endergonice automat creşte cantitatea de ADP şi fosfat anorganic,care la rîndul lor permit realizarea respiraţiei.Deci,cuplarea transferului de electroni cu fosforilarea în mitocondriile normale crează condiţiile în care viteza oxidării substanţelor nutritive este reglată de cerinţele energetice ale celulei.

Fosforilarea oxidativă este un proces foarte labil.In prezenţa decuplanţilor,transportul electronilor de la NADH la O_2 continuă,dar ATP nu se sintetizează.Exemplu clasic de asemenea decuplant este 2,4-dinitrofenolul(DNP) care poate să substituie substanţa X în procesul de fosforilare oxidativă(fig.8.32).DNP stimulează respiraţia în absenţa ADP şi H_3PO_4,de asemenea,activează ATP-aza.In mod analog acţionează fenolii substituiţi,fenilhidrazinele,dicumarolul,gramicidina,arsenitul etc.

Decuplarea fosforilării oxidative poate fi biologic utilă. Ea generează căldura pentru menţinerea temperaturii corpului în cazul animalelor care hibernează,unor animale nou-născute şi mamiferelor adaptate la frig.Tesutul adipos brun care conţine foarte multe mitocondrii este specializat pentru procesul de termogeneză.Acizii graşi acţionează ca decuplanţi în ţesutul adipos brun.

9.METABOLISMUL LIPIDELOR

Lipidele se disting prin eterogenitate structurală şi funcţională.De aceea se va studia separat metabolismul fiecărei clase de lipide şi al constituenţilor lor.

In organismele animale şi vegetale metabolismul diferitelor lipide se desfăşoară,în general,pe căi anabolice şi catabolice asemănătoare.

9.1.METABOLISMUL TRIACILGLICEROLILOR

Pentru organismul viu triacilglicerolii(trigliceridele sau grăsimele neutre) reprezintă cea mai concentrată rezervă de energie chimică potenţială.Prin oxidarea completă a 1 g de triacilglicero-li se obţin 9 kilocalorii,deci dublu faţă de cît produce aceeaşi cantitate de glucide sau proteine.Această diferenţă în randamentul caloric se datoreşte faptului că acizii graşi sînt mult mai puternic reduşi.Prin urmare,triacilglicerolii sînt nepolari şi pot fi depozitaţi într-o formă aproape anhidră,constituind cauzele pentru care ei au fost selectaţi în evoluţie ca rezervă majoră de energie.

Majoritatea plantelor superioare şi inferioare conţin triacilglicerolii de rezervă în seminţe.La animale triacilglicerolii îndeplinesc rolul de produşi de rezervă finali sau temporari.Rezervele finale,de exemplu,trigliceridele din lapte,nu sînt utilizate de organismul care le-a sintetizat.Triacilglicerolii de rezervă temporari se acumulează sub formă de picături în citosolul celulelor adipoase,de unde pot fi uşor mobilizaţi şi transportaţi de sînge spre alte ţesuturi.Transportul triacilglicerolilor,colesterolului şi al altor lipide în organismul animal se realizează de către o serie de lipoproteine clasificate după densitatea crescîndă în: chilomicroni,lipoproteine cu densitate foarte mică(VLDL), lipoproteine cu densitate mică(LDL) şi lipoproteine cu densitate mare(HDL).Lipoproteinele plasmatice sînt sintetizate şi secretate de ficat şi intestin.Chilomicronii,reprezentînd cele mai numeroase lipoproteine,transportă triacilglicerolii alimentari,colesterolul şi alte lipide din intestin spre ţesutul adipos şi ficat.Densitatea chilomicronilor este foarte mică($<0,94\ g/cm^3$) întrucît în compoziţia lor intră o cantitate mare de triacilglicerolii(83%) şi au

un conținut de proteine sub 2%. VLDL se sintetizează inițial în ficat și cedează triacilglicerolii formați endogen către țesutul adipos. Prin aceasta VLDL se transformă în LDL care sînt cele mai bogate în colesterol esterificat(38%). LDL au rolul de a transporta colesterolul spre țesuturile periferice. HDL se formează în ficat și conțin cele mai multe fosfolipide(29%), alături de cantități însemnate de colesterol liber și esterificat. HDL ar fi implicate în transportul colesterolului de la țesuturile periferice la ficat. Cercetări mai recente susțin că nu colesterolul din sînge, ci raportul dintre cantitatea de LDL și cea de HDL ar fi determinant în generarea arteriosclerozei.

9.1.1. CATABOLISMUL TRIACILGLICEROLILOR

9.1.1.1. Hidroliza enzimatică a triacilglicerolilor

Prima etapă în catabolismul triacilglicerolilor animali sau vegetali o constituie eliberarea acizilor grași din compoziția acestor substanțe de rezervă. Hidroliza triacilglicerolilor în glicerol și acizi grași, cunoscută și sub numele de lipoliză, este catalizată de enzimele denumite lipaze. Lipazele din majoritatea organismelor vii, atacă, în primul rînd, legăturile α-esterice și apoi legătura β-esterică, conform mecanismului din fig. 9.1.

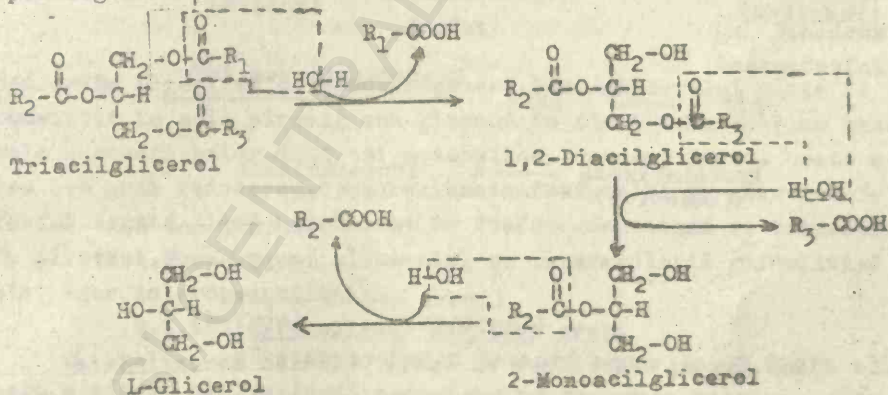


Fig. 9.1. Hidroliza triacilglicerolilor sub acțiunea lipazelor.

Lipazele se întîlnesc în țesuturile animale, plante și multe microorganisme. Toate lipazele manifestă o specificitate de substrat largă, ele putînd să descompună esterii glicerolului, dar și ai alcoolilor monohidroxilici. Lipazele de diferite origini se

deosebesc după pH optim de activitate. Lipaza pancreatică are pH optim de acţiune egal cu 8,0-8,1. Lipaza din boabele de ricin posedă un pH optim în domeniul 3,6-4,4 şi un al doilea optim de activitate la pH 5,4. Optimum de pH al lipazei din A.niger se află la 5,6.

Organismele animale conţin trei tipuri de lipaze: lipaze digestive, lipaze din lapte şi lipaze tisulare. Lipazele digestive sînt sintetizate de pancreas care le secretă în duoden, unde aceste enzime hidrolizează triacilglicerolii din hrană. Acţiunea lipazelor pancreatice este mult mai eficientă în prezenţa sărurilor biliare.

Tesutul adipos conţine o lipază a cărei activitate este reglată de hormoni într-un mod asemănător cu cel notat la degradarea glicogenului(8.2.2.2). Adrenalina, glucagonul, hormonul adrenocorticotropic şi tirostimulina activează adenilatciclaza celulelor adipoase. AMP ciclic format sub acţiunea adenilatciclazei stimulează o proteinkinază care fosforilează lipaza activînd-o(fig. 9.2). Deci hormonii menţionaţi cauzează lipoliza, în urma căreia are loc mobilizarea triacilglicerolilor de rezervă. AMP ciclic

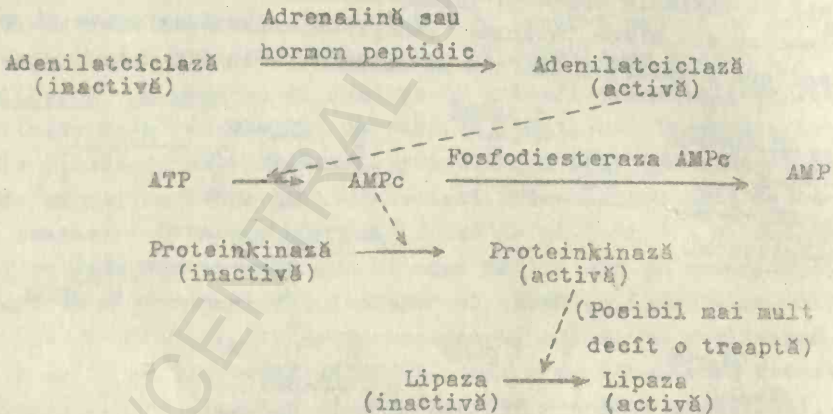


Fig.9.2. Activarea lipazei hormon-sensibile.

este un mesager secundar în activarea lipolizei în celulele adipoase. In contrast, insulina inhibă formarea AMPc şi ca urmare lipoliza.

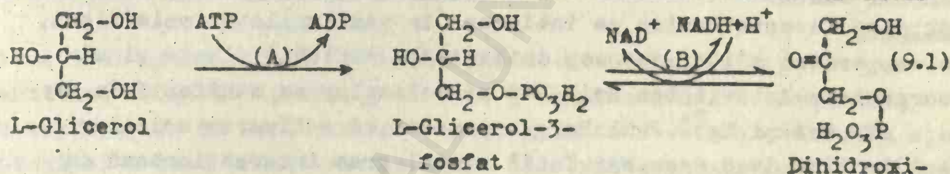
In serul sanguin există o lipoproteinlipază care hidrolizează triacilglicerolii din chilomicroni. Acizii graşi eliberaţi ast-

fel pot pătrunde în celulă,unde din nou participă la sinteza lipidelor.Lipoproteinlipaza provine atît din ficat cît şi din ţesutul adipos.Deficitul aceştei enzime în ţesuturi cauzează boala ereditară numită hiperchilomicronemie(hiperlipemie esenţială) care constă în mărirea concentraţiei de lipide sanguine.

Lipazele animale sau microbiene se folosesc în diferite sectoare ale industriei alimentare,industriei uşoare etc.In acelaşi timp,într-o serie de ramuri industriale lipazele exercită o acţiune dăunătoare,producînd degradarea diverselor produse alimentare şi materii prime.

9.1.1.2.Metabolizarea glicerolului

Glicerolul rezultă în lipoliză este fosforilat de ATP sub influenţa glicerolkinazei(etapa A în ecuaţia 9.1).Glicerolfosfatdehidrogenaza oxidează L-glicerol-3-fosfatul format în dihidroxiacetonfosfat(etapa B în ecuaţia 9.1),care la rîndul său este izomerizat în gliceraldehid-3-fosfat.Ultimul metabolit este un inter-



mediar în glicoliză şi gluconeogeneză.Deci glicerolul poate fi convertit în acid piruvic sau glucoză în ficat care conţine enzimele necesare celor două căi metabolice.Procesul invers poate avea loc prin reducerea dihidroxiacetonfosfatului în glicerol-3-fosfat.Acesta fiind hidrolizat de fosfomonoesterază se transformă în glicerol.Prin urmare,glicerolul şi intermediarii glicolitici sînt uşor interconvertibili.

9.1.1.3.Catabolismul acizilor graşi

Catabolizarea acizilor graşi se realizează pe mai multe căi. Foarte importantă este oxidarea acizilor graşi care se poate desfăşura după trei mecanisme diferite.

β-Oxidarea acizilor graşi.Majoritatea celulelor aerobe sînt capabile să oxideze complet acizii graşi la CO_2 şi H_2O.cu producerea unei cantităţi apreciabile de energie pentru organismul viu. Incă în anul 1904 Franz Knoop a arătat că acizii graşi sînt degra-

daţi în ţesuturile vii prin oxidare la carbonul β,conducînd la scindarea treptată a unui fragment de doi atomi de carbon sub formă de acid acetic.Această transformare oxidativă a fost numită β-oxidarea acizilor graşi.Cercetările ulterioare,efectuate de Henry Dakin,Fritz A.Lipmann(1945),David Nachmanson(1946),Feodor Lynen (1951),Henry Mahler,Saleh Waikil etc.,au confirmat teoria lui Knoop şi au permis stabilirea mecanismului chimic concret al β-oxidării acizilor graşi.

S-a constatat că acest proces are loc în matrixul mitocondriilor celulelor eucariote(Eugene Kennedy şi Albert Lehninger,1949) şi începe cu o reacţie în urma căreia acidul gras se transformă în derivatul hidrosolubil acil-CoA,care este o combinaţie macroergică: R-CO~S-CoA.

Formarea derivaţilor acil-CoA,purtînd şi numele de activarea acizilor graşi,este catalizată de acil-CoA sintetaze(acid gras tiokinaze).Aceste enzime se întîlnesc în ţesuturile animale(ficat, creier,ţesutul adipos,mucoasa intestinală,rinichi),plante şi microorganisme.Activitatea acil-CoA sintetazelor se manifestă în prezenţa ATP,CoA şi Mg^{2+}.Paul Berg a dovedit că activarea acizilor graşi implică două faze.Mai întîi acidul gras interacţionează cu ATP şi se formează aciladenilatul(acil-AMP).Acest produs intermediar rămîne puternic legat cu acil-CoA sintetaza pînă ce intră în reacţie coenzima A,rezultînd acil-CoA şi AMP(fig.9.3).Reacţiile parţiale din fig.9.3,luate separat sînt uşor reversibile.In practică,constanta de echilibru pentru suma acestor reacţii este 1 :

$$R\text{-}COOH + CoA\text{-}SH + ATP \rightleftharpoons R\text{-}CO\sim S\text{-}CoA + AMP + PP_i \quad .$$

Acil-CoA sintetazele se descoperă în reticulul endoplasmatic şi în membrana exterioară a mitocondriilor.Unele acil-CoA sintetaze activează acizii graşi cu catenă medie(C_4-C_{12}),altele - acizii cu catenă mai lungă.

AMP rezultat în reacţia catalizată de acil-CoA sintetază(fig. 9.3) interacţionează cu ATP,sub influenţa adenilatkinazei,dînd 2 ADP,care din nou se transformă în ATP în procesul de fosforilare la nivelul substratului sau în procesul de fosforilare oxidativă.

Majoritatea acizilor graşi se activează în exteriorul mitocondriilor.Moleculele acizilor graşi cu catenă lungă activaţi nu pot penetra uşor membrana mitocondrială internă.Derivaţii acil-CoA

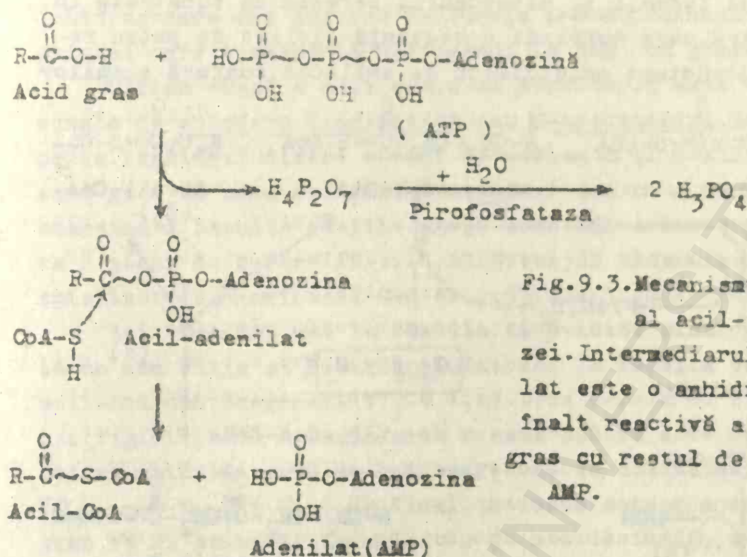
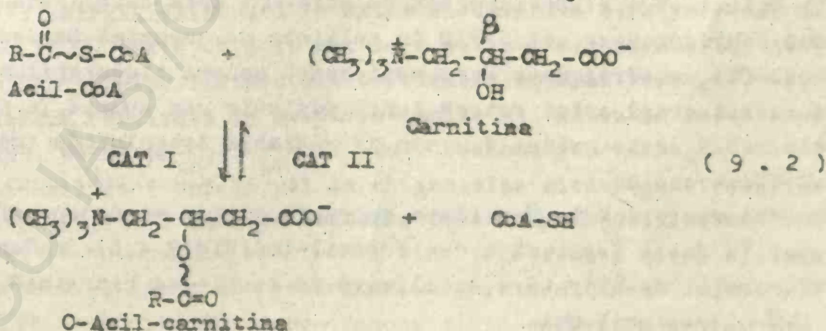


Fig.9.3.Mecanismul de acţiune al acil-CoA sintetazei. Intermediarul acil-adenilat este o anhidridă mixtă, înalt reactivă a acidului gras cu restul de fosfat al AMP.

citosolici pătrund în mitocondrii printr-un sistem <u>navetă</u> în care carnitina(betaina acidului β-hidroxi-γ-aminobutiric) acţionează ca transportor de acil. Restul de acid gras de la atomul de S al coenzimei A este transferat la grupa hidroxil a carnitinei, cu formarea <u>O-acil-carnitinei</u> conţinînd o legătură O-acil macroergică (ecuaţia 9.2). Această reacţie este catalizată de <u>carnitin-acil-transferaza I</u>(CAT I), localizată în citoplasmă şi în membrana mitocondrială externă. Acil-carnitina difuzează în membrana mitocondrială internă, unde <u>carnitinaciltransferaza II</u>(CAT II) aflată pe suprafaţa interioară a acestei membrane catalizează transferul restului acil la CoA intramitocondrială(ecuaţia 9.2).



Compuşii acil-CoA formaţi în mitocondrii servesc ca substrate în procesul de β-oxidare, care cuprinde o secvenţă ciclică de patru reacţii (fig.9.4). Structura moleculelor de acil-CoA conferă atomilor

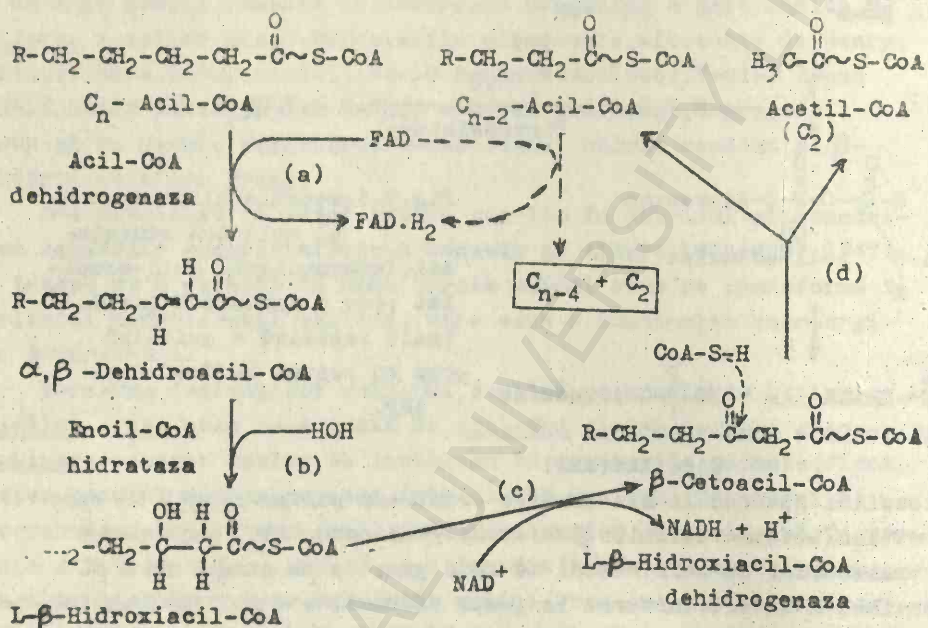


Fig.9.4. Oxidarea acil-CoA în matrixul mitocondriilor pe calea β-oxidării.

de H de la C-α al radicalului de acid gras o reactivitate crescută. Rezultă că β-oxidarea acil-CoA poate continua numai cu o reacţie de dehidrogenare, prin scindarea cîte unui atom de H din poziţiile α şi β ale restului de acid gras, conducînd la trans-α,β-dehidroacil-CoA (fig.9.4,a). Dehidrogenarea acil-CoA este catalizată de acil-CoA dehidrogenaze, avînd FAD în calitate de coenzimă. Se deosebesc acil-CoA dehidrogenaze care acţionează asupra tioesterilor CoA cu acizii graşi avînd catenă lungă, mijlocie sau scurtă. In fiecare caz, $FAD.H_2$ este oxidat din nou de enzimele lanţului de transport al electronilor.

Următoarea etapă în β-oxidare cuprinde adiţia stereospecifică a apei la dubla legătură a dehidroacil-CoA (fig.9.4,b). Produsul acestei reacţii de hidratare, catalizată de enoil-CoA hidratază, este L-β-hidroxiacil-CoA.

Oxidarea L-β-hidroxiacil-CoA pe calea scindării a 2H de la C-β este însoţită de formarea β-cetoacil-CoA(fig.9.4,c).Această dehidrogenare are loc sub influenţa L-β-hidroxiacil-CoA dehidrogenazei care transportă hidrogenul la NAD^+ cu generarea NADH.

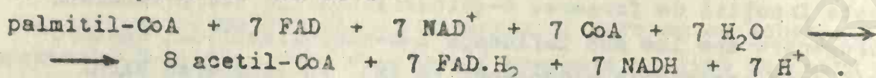
Ultima etapă a unui ciclu al β-oxidării este cunoscută sub numele de scindare tioclastică sau β-cetotioliză.Ea constă în ruperea legăturii dintre atomii de carbon α şi β ai radicalului de acid gras în urma reacţiei β-cetoacil-CoA cu o nouă moleculă de coenzima A.Rezultă acetil-CoA şi acil-CoA avînd catena mai scurtă cu 2 atomi de carbon(fig.9.4,d).Clivajul tiolitic discutat este catalizat de β-cetoacil-CoA tiolază(acetil-CoA—aciltransferaza).

Acil-CoA obţinut în reacţia de β-cetotioliză poate să suporte un nou ciclu al β-oxidării,intrînd în reacţia catalizată de acil-CoA dehidrogenază(fig.9.4,a).Prin repetarea ciclului de reacţii(fig.9.4,a-d) se scindează o nouă moleculă de acetil-CoA şi catena acidului gras se mai scurtează cu doi atomi de carbon ($C_{n-2} \longrightarrow C_{n-4} + C_2$).In final,întreaga catenă a restului de acid gras va fi scindată în molecule de acetil-CoA($C_n \longrightarrow n/2\ C_2$).Prin urmare,produsul final al β-oxidării acizilor graşi cu catenă neramificată,alcătuită dintr-un număr par de atomi de carbon este acetil-CoA.Dacă molecula acidului gras conţine un număr impar de atomi de carbon,în ultimul ciclu al β-oxidării se obţine propionil-CoA şi acetil-CoA.

Acetil-CoA formată în urma β-oxidării acizilor graşi poate să joace rolul de precursor în diferite biosinteze sau poate să fie oxidată la CO_2 şi H_2O,cu eliberarea unei cantităţi însemnate de energie.In acest ultim caz,acetil-CoA se condensează cu acidul oxalilacetic şi se integrează astfel în ciclul Krebs(8.2.6.2.1), unde are loc oxidarea completă a restului acetil.

Energia eliberată în oxidarea completă a acizilor graşi la CO_2 şi H_2O este cu mult mai mare decît cea obţinută în catabolismul glucidelor sau proteinelor.Pentru exemplificare,să calculăm energia rezultată în oxidarea completă a acidului palmitic.Degradarea palmitil-CoA(C_{16}-acil-CoA) reclamă repetarea ciclului β-oxidării de 7 ori.In cel de al şaptelea ciclu,C_4-cetoacil-CoA este tiolizată în două molecule de acetil-CoA.Deci,stoichiometria

oxidării palmitil-CoA este :



$$\text{palmitil-CoA} + 7\ FAD + 7\ NAD^+ + 7\ CoA + 7\ H_2O \longrightarrow$$
$$\longrightarrow 8\ \text{acetil-CoA} + 7\ FAD.H_2 + 7\ NADH + 7\ H^+ .$$

Dacă fiecare moleculă de NADH este oxidată de lanţul respirator se formează 3 ATP,iar fiecare $FAD.H_2$ generează 2 ATP.Reamintim că oxidarea restului acetil din acetil-CoA în ciclul Krebs este însoţită de sintetizarea a 12 ATP.Prin urmare,numărul molilor de ATP formaţi în oxidarea palmitil-CoA este 14 pentru 7 $FAD.H_2$,21 pentru 7 NADH şi 96 pentru 8 molecule de acetil-CoA,ceea ce înseamnă un total de 131 ATP.Scăzînd 2 ATP consumate în etapa de activare a acidului palmitic,obţinem pentru oxidarea completă a palmitil-CoA un randament de 129 ATP.Luînd în considerare că energia liberă standard($\Delta G^{o'}$) la oxidarea completă a acidului palmitic pînă la CO_2 şi H_2O este -9782 KJ/mol,iar $\Delta G^{o'}$ la fosforilarea ADP are valoarea +30,5 KJ/mol,constatăm că energia se înmagazinează cu o eficienţă de $129 \times 30,5 \times 100/9782 = 40,2\ \%$.

<u>α-Oxidarea</u> <u>acizilor</u> <u>graşi</u>.In organismele vii,predominant la plante,oxidarea acizilor graşi superiori adesea se produce pe calea scindării succesive a unui atom de carbon de la capătul catenei cu grupa carboxil.Acest proces în care este implicat atomul de carbon din poziţia α a catenei acidului gras se numeşte <u>α-oxidare</u>.

La plante α-oxidarea acizilor graşi a fost descoperită atît în seminţe cît şi în frunze.

Mecanismul probabil al α-oxidării acizilor graşi s-ar desfăşura după schema din fig.9.5.Prima etapă a acestui proces este catalizată de o flavoproteină care conţine FAD,probabil în forma radicalului liber de semichinonă(XH).Sub acţiunea acestei enzime într-o reacţie stereospecifică are loc îndepărtarea H_D de la C-α al acidului gras liber.Flavoproteina redusă care se formează(XH_2) interacţionează apoi cu O_2,dînd aductul XH_2O_2.Ultimul acţionează asupra radicalului liber de acid gras(rezultat după atacul iniţial) obţinîndu-se 2-D-hidroperoxiacid,care ulterior poate să fie supus în continuare α-oxidării pe calea anhidrodecarboxilării cu formarea aldehidei,sau se reduce pînă la 2-D-hidroxiacid.

Aldehida acidului gras,conţinînd cu un atom de carbon mai puţin decît acidul gras iniţial,se oxidează apoi sub acţiunea

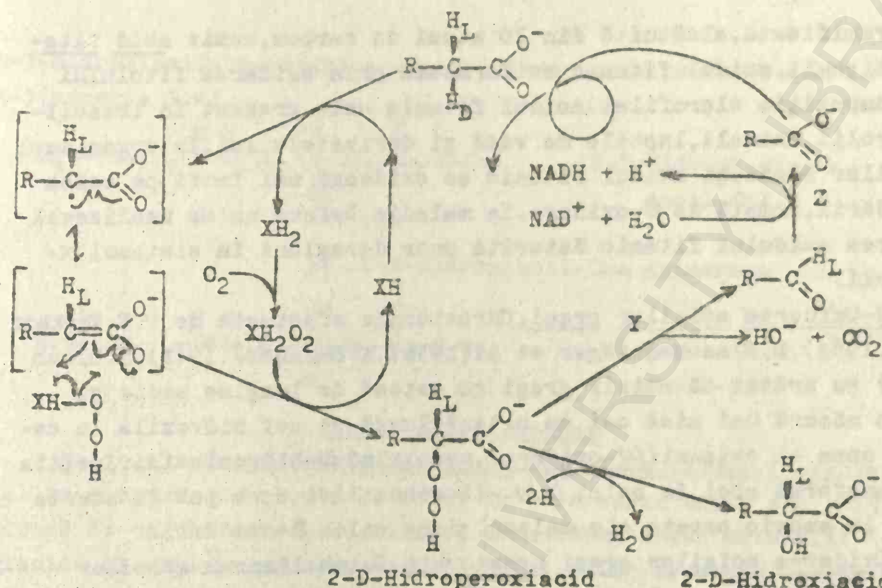


Fig.9.5.Mecanismul probabil al α-oxidării acizilor grași la plante(X - flavoproteină conținînd FAD; Y - anhidrodecarboxilaza; Z - aldehid-dehidrogenaza NAD-dependentă).

aldehid-dehidrogenazei NAD-dependente pînă la acidul gras corespunzător. In acest fel se încheie un tur al spiralei α-oxidării. După fiecare tur are loc scurtarea succesivă a catenei acidului gras cu cîte un atom de carbon.

In ce privește rolul fiziologic al α-oxidării s-a emis presupunerea că ea poate participa la scindarea acizilor grași cu catenă ramificată. Procesul de α-oxidare constituie o sursă de acizi grași cu număr impar de C, precum și de 2-D-hidroxiacizi care sînt componenții cerebrozidelor la plantele superioare.

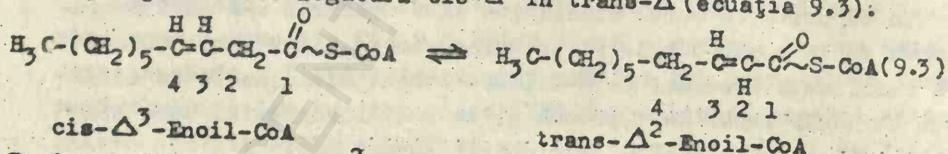
α-Oxidarea acizilor grași într-o oarecare măsură se desfășoară, de asemenea, în țesuturile animale, mai ales în creier ale cărui lipide conțin 2-hidroxiacizi cu catenă lungă. In cazurile acizilor grași cu grupa metil în poziția 3 se observă blocarea β-oxidării și ca o cale indirectă se folosește uneori α-oxidarea.

La oamenii cu maladia Refsum - tulburare ereditară(autosomală recesivă) a metabolismului lipidic care influențează sistemul nervos, se acumulează în țesuturi și în sînge un acid gras cu ca-

tenă ramificată,alcătuită din 20 atomi de carbon,numit acid fitanic.Obişnuit acidul fitanic se formează prin oxidarea fitolului din compoziţia clorofilei.Acidul fitanic este prezent în triacilglicerolii animali,laptele de vacă şi derivatele lui.In organismul oamenilor sănătoşi acidul fitanic se oxidează mai întîi pe calea α-oxidării,urmată de β-oxidare.In maladia Refsum nu se realizează oxidarea acidului fitanic datorită unor dereglări în sistemul α-oxidării.

ω-Oxidarea acizilor graşi.Cercetările efectuate de P.E.Verkade (1931,1934),B.Flaschenträger et al(1936),K.Bernhard(1941),K.Bloch (1964) au arătat că acizii graşi cu catenă de lungime medie şi într-o măsură mai mică cei cu catenă lungă se pot hidroxila la capătul opus al catenei(ω-oxidare),rezultînd ω-hidroxiacizi.Aceştia se transformă apoi în acizi α,ω-dicarboxilici care pot fi scurtaţi de la ambele capete ale moleculei pe calea β-oxidării.

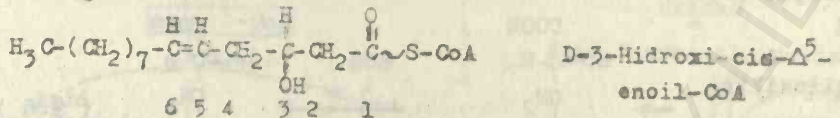
Oxidarea acizilor graşi nesaturaţi.Catabolizarea acizilor graşi nesaturaţi mai larg răspîndiţi,de exemplu,acizii oleic şi palmitoleic,cu o dublă legătură între C-9 şi C-10,are loc pe calea β-oxidării,însă după cel de al treilea ciclu de scindare a acetil-CoA,se formează ca produs intermediar cis-Δ^3-enoil-CoA.Prezenţa dublei legături între C-3 şi C-4 împiedică formarea altei legături duble între C-2 şi C-3.Acest impas este rezolvat de o cis-Δ^3-trans-Δ^2-enoil-CoA izomerază care schimbă poziţia şi configuraţia dublei legături cis-Δ^3 în trans-Δ^2(ecuaţia 9.3):

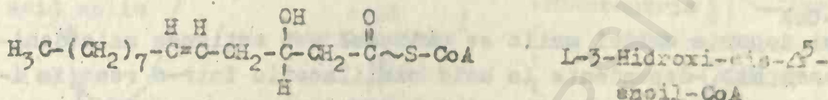


Produsul format,trans-Δ^2-enoil-CoA fiind un substrat al acil-CoA dehidrogenazei(fig.9.4,a) poate fi oxidat mai departe pe calea scindării acetil-CoA.

Acizii graşi cu două duble legături cis-Δ^6 şi cis-Δ^9 suportă două cicluri ale β-oxidării.Apoi,cis-Δ^2,Δ^5-enoil-CoA se hidratează,sub acţiunea enoil-CoA hidratazei(fig.9.4,b),dînd însă izomerul D al 3-hidroxiacil-CoA care nu poate fi oxidat de L-3-hidroxiacil-CoA dehidrogenază.Această dificultate este depăşită datorită

D-3-hidroxiacil-CoA epimerazei care inversează configurația la C-3(ecuația 9.4).



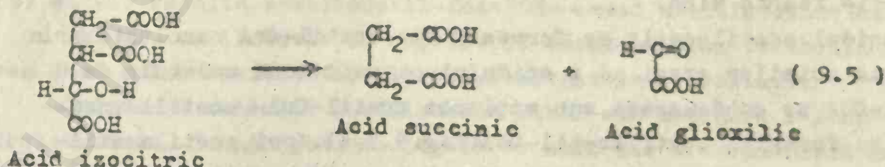


9.1.1.4. Ciclul glioxilatului

Multe microorganisme(*Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Tetrahymena*) și ciuperci, cultivate pe medii în care sursa unică sau principală de carbon este acetatul, pot transforma acest metabolit în glucide și alți componenți chimici celulari. De asemenea, în germinația semințelor de plante oleaginoase, conținînd o mare cantitate de triacilglicerol de rezervă, are loc transformarea acestor substanțe în glucide necesare pentru creșterea plantelor.

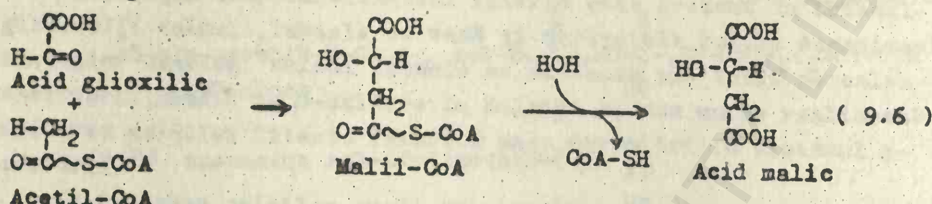
La baza conversiei substanțelor menționate în glucide se află o serie de reacții la care participă acidul glioxilic. Această succesiune de reacții, constituind o variantă a ciclului acizilor tricarboxilici, este denumită ciclul glioxilatului(fig.9.6).

Primele două reacții ale ciclului glioxilatului sînt identice cu reacțiile corespunzătoare din ciclul ATC(8.2.6.2.1). Următoarele două reacții sînt specifice pentru ciclul glioxilatului. Ele sînt catalizate de izocitrat-liază și malat-sintază. La plante aceste enzime se află localizate în structurile subcelulare numite glioxisomi. Izocitrat-liaza catalizează scindarea aldolică a acidului izocitric cu formarea acidului succinic și acidului glioxilic(ecuația 9.5).



Malat-sintaza realizează condensarea acidului glioxilic

cu acetil-CoA(acesta este a doua moleculă de acetil -CoA care intră în ciclul glioxilatului),conducînd la formarea acidului L-malic(ecuaţia 9.6).



Mai departe acidul malic se oxidează sub acţiunea malatdehidrogenazei NAD^{+}-dependente la acid oxalilacetic într-o reacţie identică cu reacţia finală din ciclul ATC. Intrucît această reacţie conduce la regenerarea acidului oxalilacetic,una din cele două combinaţii iniţiale,ea desăvîrşeşte de asemenea ciclul glioxilatului.

Produsul ciclului glioxilatului este acidul succinic format în ecuaţia 9.5..In fiecare tur al ciclului din două molecule de acetil-CoA se sintetizează o moleculă de acid succinic(fig.9.6). In glioxisom acidul succinic nu poate fi supus transformărilor ulterioare din cauza lipsei enzimelor corespunzătoare.De aceea acidul succinic iese din glioxisom şi pătrunde în mitocondrie,unde se transformă în acid oxalilacetic,cu formarea de acid fumaric şi acid L-malic,sub influenţa enzimelor corespunzătoare ale ciclului acizilor tricarboxilici.Acidul oxalilacetic este convertit de către fosfoenolpiruvat-carboxikinază în acid fosfoenolpiruvic şi mai departe în D-glucoză.Astfel,acetil-CoA obţinută în β-oxidarea acizilor graşi poate fi utilizată pentru sinteza glucidelor.

9.1.1.5.Formarea corpilor cetonici

Sub denumirea de corpi cetonici sînt cunoscuţi următorii trei compuşi organici: acidul acetilacetic,acidul D-β-hidroxibutiric şi acetona,care se găsesc în sîngele omului şi vertebratelor în concentraţie foarte mică.

Acidul acetilacetic se formează din acetil-CoA rezultată prin oxidarea acizilor graşi şi a acidului piruvic.Două molecule de acetil-CoA se condensează,sub acţiunea acetil-CoA—acetiltransferazei,cu formarea acetilacetil-CoA(fig.9.7,a).Apoi,acetilacetil-CoA pierde coenzima A şi se transformă în acid acetilacetic,pro-

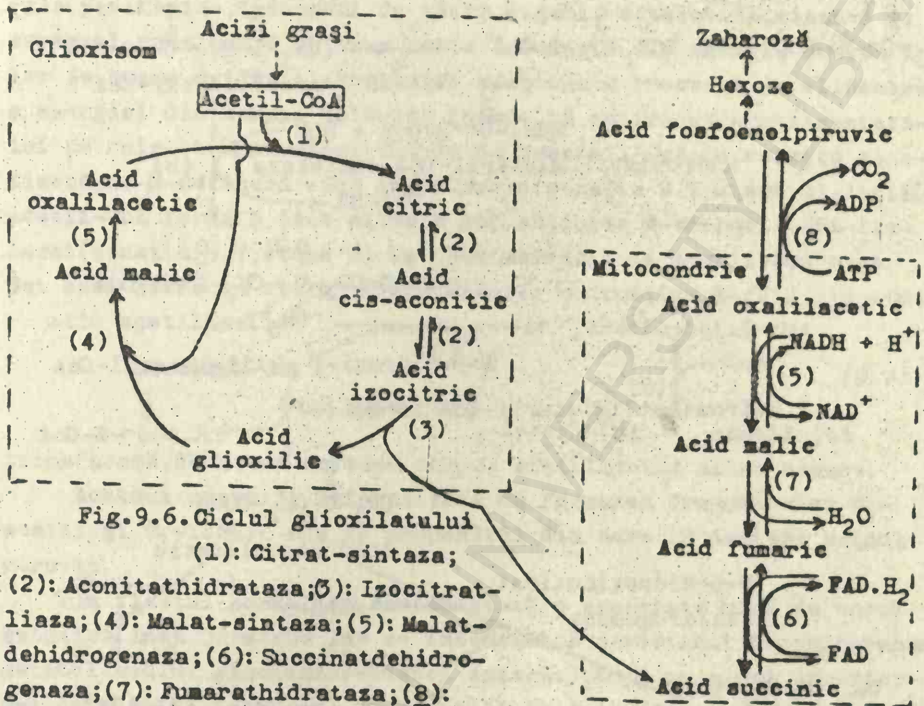


Fig.9.6.Ciclul glioxilatului
(1): Citrat-sintaza;
(2): Aconitathidrataza;(3): Izocitrat-liaza;(4): Malat-sintaza;(5): Malat-dehidrogenaza;(6): Succinatdehidrogenaza;(7): Fumarathidrataza;(8): Fosfoenolpiruvat-carboxikinaza.

ces definit ca deacilare. Calea principală pe care se realizează deacilarea acetilacetil-CoA în ficat cuprinde sinteza şi scindarea enzimatică a β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA(HMG-CoA), important produs intermediar în biosinteza sterolilor şi în degradarea leucinei. HMG-CoA se obţine prin condensarea acetilacetil-CoA cu o moleculă de acetil-CoA, conform reacţiei catalizate de hidroximetilglutaril-CoA sintetază(fig.9.7,b). Scindarea HMG-CoA de către hidroximetilglutaril-CoA liază(fig.9.7,c) conduce la formarea cantităţii majore de acid acetilacetic în ficat. Sumînd reacţiile (b) şi (c) rezultă: acetilacetil-CoA+HOH⟶acid acetilacetic+CoA.

Acidul acetilacetic ia naştere, de asemenea, prin catabolizarea unor aminoacizi(leucină, lizină, fenilalanină, tirozină).

Reducerea acidului acetilacetic liber sub acţiunea D-β-hidroxibutirat-dehidrogenazei, legată cu membrana mitocondrială internă, dă acidul D-β-hidroxibutiric(fig.9.7,d). Deşi această reac-

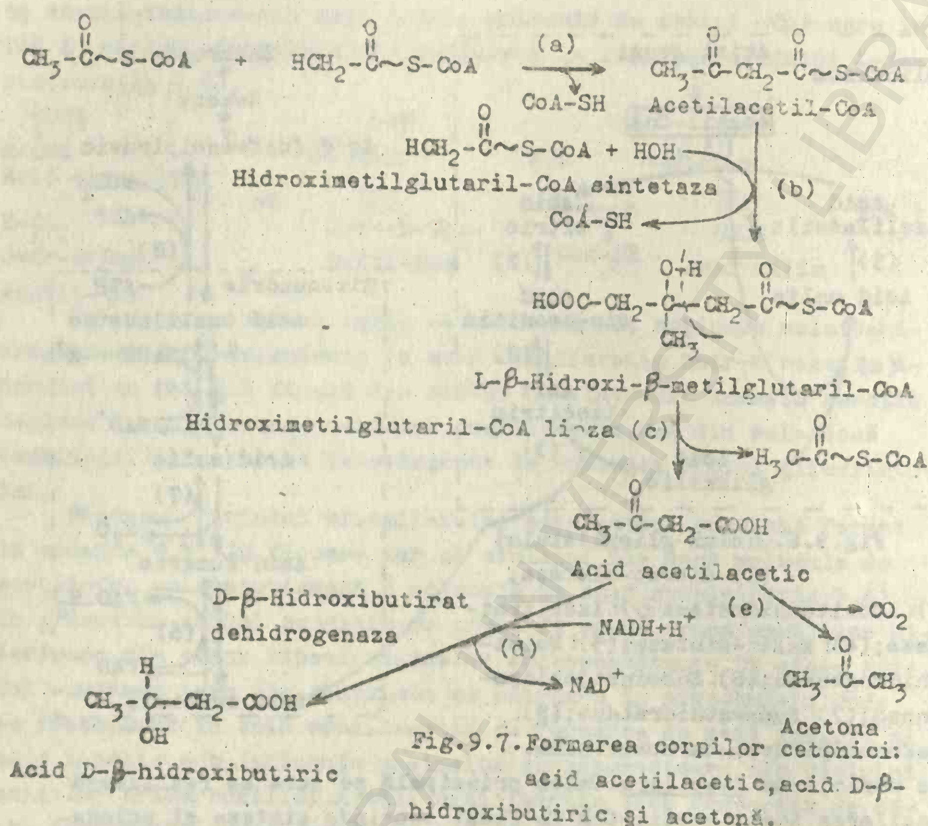


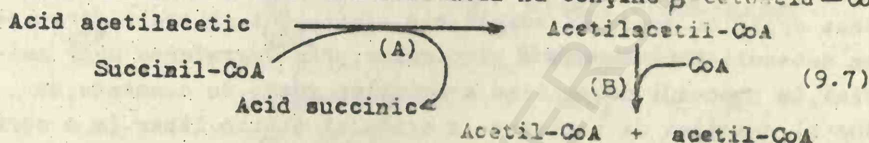
Fig.9.7. Formarea corpilor cetonici: acid acetilacetic, acid D-β-hidroxibutiric şi acetonă.

ţie este reversibilă, se observă oscilaţii mari în cantităţile şi rapoartele celor doi acizi indicaţi în sînge : cînd ficatul conţine mult glicogen predomină formarea acidului D-β-hidroxibutiric, iar cînd rămîne puţin glicogen hepatic, se evidenţiază mai mult acid acetilacetic.

Suferind o decarboxilare, probabil spontană, acidul acetilacetic se transformă în acetonă (fig.9.7, e).

Locul de sinteză a corpilor cetonici îl constituie ficatul. Din acest organ corpii cetonici difuzează în sînge care-i transportă spre ţesuturile periferice. Concentraţia totală a corpilor cetonici în sînge, exprimată sub formă de acid β-hidroxibutiric, de obicei nu depăşeşte 3 mg/100 ml. Aceasta este condiţionată de o utilizare preferenţială a acidului acetilacetic de către ţesutu-

rile periferice,îndeosebi de către muşchii scheletici,miocard şi cortexul renal,care obţin o parte însemnată din energia necesară lor pe seama oxidării substanţei menţionate.Procesul de eliberare a energiei din corpii cetonici începe cu activarea acetilacetatului pe calea transferului CoA de la succinil-CoA în reacţia catalizată de β-cetoacid—CoA transferază(ecuaţia 9.7,etapa A).Acetilacetil-CoA formată este clivată sub acţiunea β-cetoacil-CoA tiolazei(ecuaţia 9.7,etapa B) în două molecule de acetil-CoA care pot apoi intra în ciclul Krebs.Ficatul nu conţine β-cetoacid—CoA



transferază,de aceea cedează acidul acetilacetic altor organe.

Acetona poate fi metabolizată cu formarea fragmentelor C_2-acetil şi C_1-formil sau în propandiol din care ia naştere acidul piruvic.

In ficatul normal se sintetizează o cantitate mică de corpi cetonici.Insă formarea lor se intensifică apreciabil în tulburarea metabolismului glucidelor(diabet zaharat),după un aport insuficient de glucide(inaniţie),în cazurile de intoxicare cu P,$CHCl_3$ sau CCl_4.In toate aceste stări patologice creşte viteza lipolizei şi de oxidare a acizilor graşi,conducînd la o cantitate de acetil-CoA mai mare decît poate fi degradată în ciclul Krebs.Creşterea conţinutului de corpi cetonici în sînge se numeşte <u>cetonemie</u>,iar apariţia lor în urină - <u>cetonurie</u>.

Formarea intensă a corpilor cetonici este dăunătoare organismului uman şi animal.Acetona manifestă influenţă nefavorabilă asupra celulei nervoase.Acumularea patologică a acizilor acetilacetic şi β-hidroxibutiric în sînge este asociată cu schimbarea pH sanguin şi intracelular,ceea ce poate determina perturbarea activităţii unor enzime.Această stare generală,caracterizată prin modificarea pH sîngelui înspre latura acidă se numeşte <u>acidoză</u>.

In concluzie,apariţia patologică a corpilor cetonici este o tulburare a metabolismului lipidelor,condiţionată de un dezechilibru al metabolismului glucidelor.

9.1.2. BIOSINTEZA TRIACILGLICEROLILOR

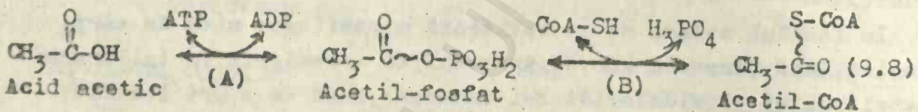
Intrucît triacilglicerolii conţin acizi graşi şi glicerol, se va discuta mai întîi biosinteza acestor componenţi.

9.1.2.1. Biosinteza acizilor graşi

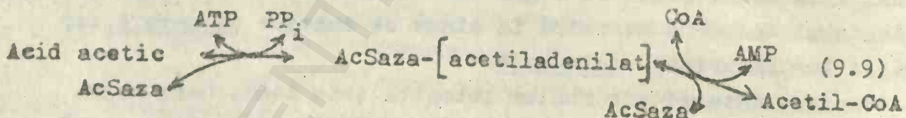
Sinteza acizilor graşi în organismul viu nu este o simplă inversare a β-oxidării.

1) Biosinteza acizilor graşi se descoperă în citosolul celulei, pe cînd β-oxidarea lor se desfăşoară în matrixul mitocondrial.

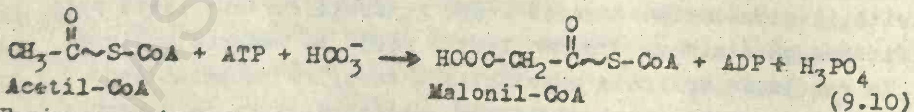
2) Acetil-CoA joacă rolul de primer (punct de start) în biosinteza acizilor graşi. In celula vie acetil-CoA se poate forma pe calea catabolizării aerobe a glucidelor, prin degradarea unor aminoacizi, în procesul de oxidare a acizilor graşi, de asemenea, ca produs al reacţiei de activare a acidului acetic liber. La o serie de microorganisme (*Bacillus acidificans*, *Clostridium kluyveri* etc.) activarea acidului acetic cuprinde două etape catalizate de acetatkinază (ecuaţia 9.8, etapa A) şi fosfat-acetiltransferază (ecuaţia 9.8, etapa B).



In organismele animale, plante şi levuri, acidul acetic se activează conform mecanismului general de activare a acizilor graşi, reacţia fiind catalizată de acetil-CoA sintetază (AcSaza) (ecuaţia 9.9).



Sinteza acizilor graşi necesită în prealabil carboxilarea acetil-CoA cu formarea malonil-CoA. Acest produs specific anabolismului acizilor graşi ia naştere în reacţia catalizată de acetil-CoA carboxilază (ecuaţia 9.10).



Enzima menţionată conţine biotina legată covalent şi este specifică faţă de Mn^{2+}. Fixarea CO_2 cuprinde două stadii. In primul sta-

diu, datorită energiei furnizate de ATP, are loc carboxilarea biotinei legată peptidic la molecula proteinică a acetil-CoA carboxilazei, rezultînd N-1'-carboxibiotin-enzima(fig.9.8,a). Ultima combinaţie, în virtutea faptului că are legătura C-N polarizată în direcţia azotului, este capabilă să carboxileze acetil-CoA, ceea ce duce la sinteza malonil-CoA(fig.9.8,b).

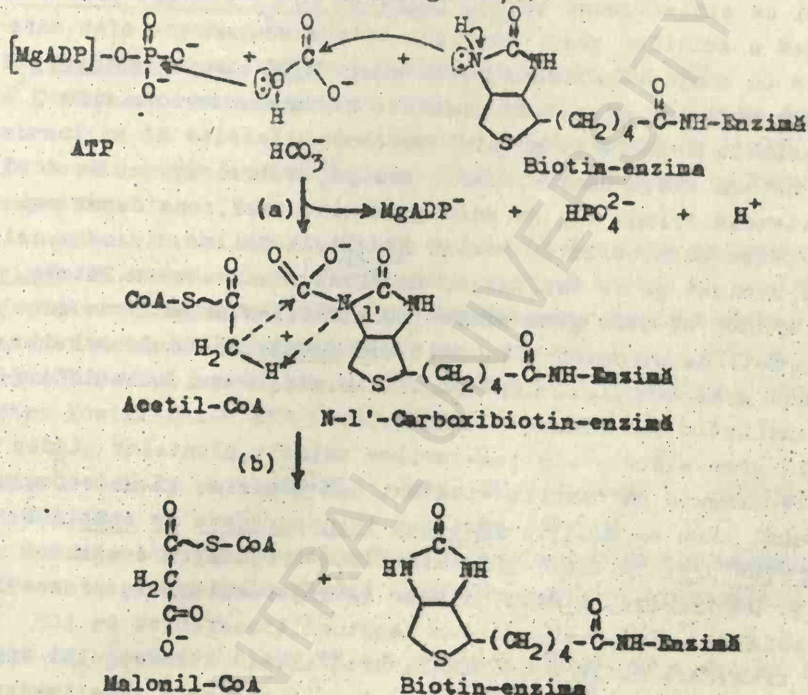


Fig.9.8. Carboxilarea acetil-CoA la malonil-CoA sub acţiunea acetil-CoA carboxilazei(biotin-enzima).

In organismele animale şi drojdii, acetil-CoA carboxilaza există sub forma unui lanţ polipeptidic multifuncţional. Acetil-CoA carboxilaza de origine animală este activată allosteric de acidul citric şi acidul izocitric care reprezintă produşi ai metabolismului glucidic. Enzima din microorganisme şi plante poate să disocieze în subunităţi active. Astfel, complexul din E.coli conţine trei proteine funcţional distincte: 1)proteina transportoare de biotincarboxil(BCCP=biotin carboxyl carrier protein) care conţine biotina legată covalent; 2)biotin-carboxilaza este implicată

în carboxilarea ATP-dependentă a BCCP;3)carboxiltransferaza catalizează transferul CO_2 de la carboxibiotina legată de proteina transportoare la acetil-CoA.

3)Malonil-CoA,formată sub acţiunea catalitică a acetil-CoA carboxilazei,se foloseşte pentru sinteza acizilor graşi saturaţi cu catenă neramificată,conţinînd un număr par de atomi de carbon; de obicei se sintetizează acidul palmitic cu 16 C.Acest proces de biosinteză a acizilor graşi cuprinde cîteva etape care sînt catalizate de un complex multienzimatic numit acid gras sintetază (sintetaza acizilor graşi).In contrast cu biosinteza acizilor graşi,enzimele β-oxidării nu sînt asociate.

In natura vie,probabil,există cel puţin două tipuri de acid gras sintetaze.Primul tip de acid gras sintetază,considerat mai primitiv,este caracteristic pentru E.coli.Al doilea tip se consideră mai evoluat şi se întîlneşte în ficatul animalelor.Datele actuale indică că acid gras sintetaza plantelor superioare este mai apropiată de sistemul enzimatic din E.coli,decît de cel din ficat.Acid gras sintetaza din drojdii aminteşte mai mult de complexul enzimatic din ficatul animalelor.

Acid gras sintetazele ţesuturilor animale,plantelor şi din E.coli reprezintă un complex alcătuit din 7 enzime şi un cofactor termostabil care se numeşte proteină transportoare de acil(ACP = acyl carrier protein).Acid gras sintetaza drojdiilor conţine 6 enzime şi ACP.Derivaţii acil,ce apar ca intermediari în procesul multistadial,se ataşează printr-o legătură tioesterică la ACP care îi transferă de la o enzimă la altă enzimă a întregului complex.ACP este analoagă prin funcţia ei cu coenzima A,care transportă derivaţii acil în β-oxidare(9.1.1.3).Din bacterii,drojdii, plante şi animale au fost izolate ACP cu M = 8.600 - 16.000.Molecula ACP conţine o unică grupă -SH cu rol funcţional,de unde notarea proteinei cu ACP~SH.Grupa -SH aparţine 4'-fosfopanteteinei, care este unită printr-o legătură fosfodiesterică cu hidroxilul serinei din poziţia 36 a catenei ACP(fig.9.9).

Biosinteza moleculei de acid gras are un caracter ciclic şi în fiecare ciclu se realizează adăugarea succesivă a unui fragment C_2,provenit din malonil-CoA,la unitatea acil care ia naştere din restul acetil al acetil-CoA.Pentru sinteza acidului palmitic cu

```
         H            H  OH CH3        O
         |            |   |  |         ||
HS-CH2-CH2-N-C-CH2-CH2-N-C-C--C--CH2-O-P-O-CH2-Ser-ACP
             ||          || |  |        |
             O           O  H  CH3      OH
```

β-Mercapto-etilamina; β-Alanina; Acid pantoic; Acid pantotenic; Panteteina

Fig.9.9.Gruparea fosfopanteteinei în structura ACP.

16 C sînt necesare 7 cicluri.Primul şi ultimul ciclu se deosebesc întrucîtva de celelalte,deoarece în aceste etape,pe lîngă reacţiile de elongaţie,au loc încă reacţiile de iniţiere şi terminare respectiv.

Primul ciclu este iniţiat de acetil-CoA care acţionează ca primer.In acest mod,în primul ciclu restul acetil al acetil-CoA constituie fragmentul acil care se lungeşte.Această elongaţie a catenei acidului gras debutează cu formarea acetil-ACP şi malonil-ACP.Restul acetil de la acetil-CoA este transferat la ACP de către acetil-CoA : ACP-transacilaza(ecuaţia 9.11).

$$\underset{\text{Acetil-CoA}}{CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim S-CoA} + ACP-SH \longrightarrow \underset{\text{Acetil-ACP}}{CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim S-ACP} + CoA-SH \quad (9.11)$$

In mod similar,restul malonil al malonil-CoA este transferat la ACP sub acţiunea malonil-CoA : ACP-transacilazei(ecuaţia 9.12).

$$\underset{\text{Malonil-CoA}}{HOOC-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim S-CoA} + ACP-SH \longrightarrow \underset{\text{Malonil-ACP}}{HOOC-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim S-ACP} + CoA-SH \quad (9.12)$$

Malonil-CoA : ACP-transacilaza are o specificitate pronunţată, însă acetil-CoA : ACP-transacilaza poate transfera atît radicalul acetil cît şi radicali acil mai lungi.Acizii graşi cu număr impar de atomi de carbon se sintetizează plecînd de la propionil-ACP care se formează din propionil-CoA prin intervenţia acetil-CoA : ACP-transacilazei.

Celelalte enzime din complexul acid gras sintetazei catalizează următoarele reacţii implicate în creşterea catenei acidului gras.Acetil-ACP se condensează cu malonil-ACP sub acţiunea β-cetoacil-ACP sintetazei(enzimei de condensare).In această reacţie de condensare apare un acid β-cetonic instabil,luat în paranteză

patrată,care se decarboxilează dînd acetilacetil-ACP(fig.9.10,reacţia 1).Datorită decarboxilării acidului β-cetonic indicat mai sus,atomul de carbon al HCO_3^- cerut pentru formarea malonil-ACP nu apare în acidul gras sintetizat.<u>Toţi atomii de carbon ai acizilor graşi avînd catenă pară provin de la acetil-CoA.</u>

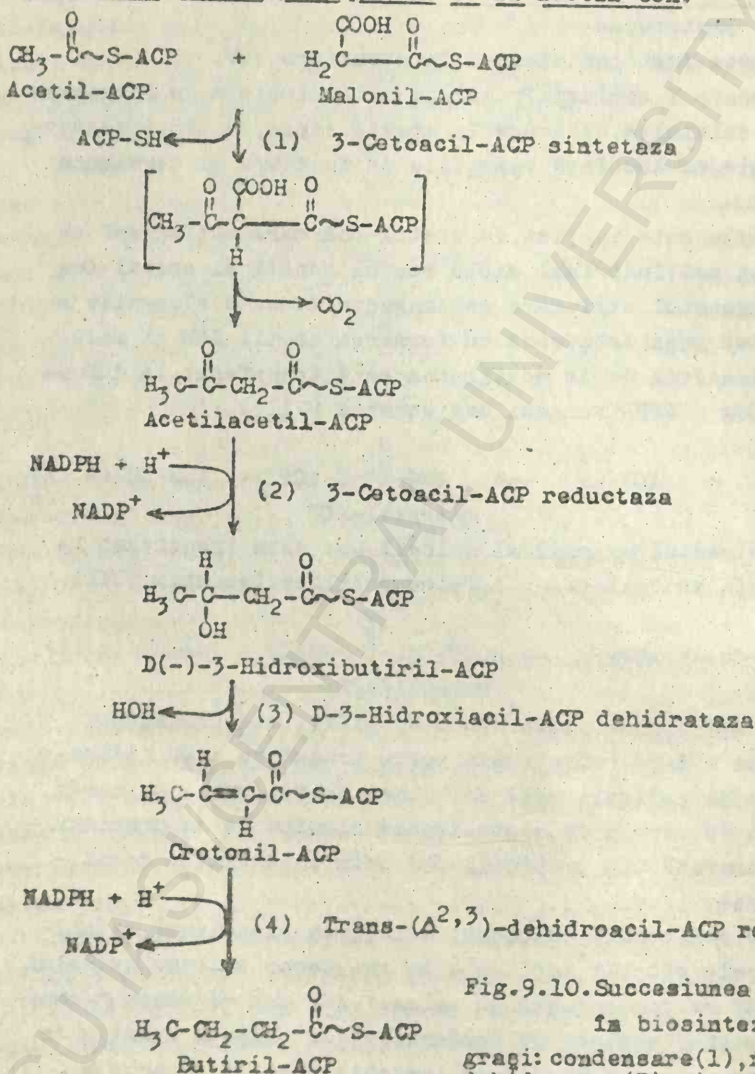


Fig.9.10.Succesiunea reacţiilor în biosinteza acizilor graşi: condensare(1),reducere(2), dehidratare(3) şi reducere(4). Intermediarii indicaţi aici se formează în primul ciclu al procesului.

Acetilacetil-ACP este redus la D(-)-3-hidroxibutiril-ACP, transformare catalizată de β-cetoacil-ACP reductază care are drept coenzimă NADPH(fig.9.10,reacţia 2).Stereoizomerul format în această etapă reductivă a biosintezei acizilor graşi are configuraţia D,pe cînd în β-oxidarea lor se obţine izomerul aparţinînd seriei L.Altă diferenţă între cele două căi metabolice constă în participarea absolută a NADPH la biosinteza acizilor graşi,în timp ce β-oxidarea lor necesită NAD^+.

Mai departe,D(-)-3-hidroxiacil-ACP dehidrataza catalizează dehidratarea D(-)-3-hidroxibutiril-ACP cu formarea C_4-trans-α,β-dehidroacil-ACP(crotonil-ACP)(fig.9.10,reacţia 3).In ultima reacţie a primului ciclu biosintetic are loc reducerea crotonil-ACP la butiril-ACP de către trans-α,β-dehidroacil-ACP reductază,avînd drept coenzimă NADPH(fig.9.10,reacţia 4).In etapa corespunzătoare a β-oxidării se foloseşte ca oxidant FAD.

In cel de al doilea ciclu al sintezei acizilor graşi are loc condensarea butiril-ACP cu o nouă moleculă de malonil-ACP conducînd la formarea 3-cetohexanoil-ACP.Prin repetarea reacţiilor (2) - (4), 3-cetohexanoil-ACP este convertit în hexanoil-ACP care poate intra în al treilea ciclu al elongaţiei.In final,pe calea creşterii succesive a catenei acil-ACP cu cîte 2 atomi de carbon se sintetizează palmitoil-ACP.Acest intermediar nu constituie un un substrat pentru 3-cetoacil-ACP sintetază şi ca atare este hidrolizat,de o deacilază numită palmitoil-ACP—tioesteraza,în acid palmitic şi ACP-SH :

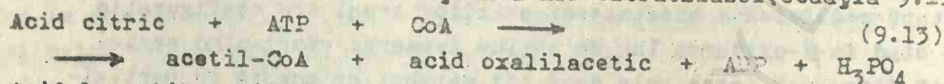


$$CH_3(CH_2)_{14}-\underset{\underset{O}{\|}}{C}\sim S-ACP \; + \; H-OH \longrightarrow CH_3(CH_2)_{14}-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-OH \; + \; ACP-SH.$$

Acid gras sintetaza mamiferelor nu posedă capacitatea să sintetizeze catene mai lungi decît C_{16}.Stoichiometria sintezei acidului palmitic este : acetil-CoA + 7 malonil-CoA + 14 NADPH + 14 H^+ $\longrightarrow$ $CH_3(CH_2)_{14}COOH$ + 7 CO_2 + 8 CoA + 14 $NADP^+$ + 6 H_2O.

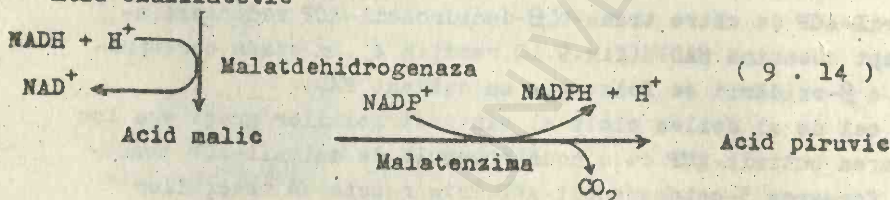
Intrucît malonil-CoA derivă din acetil-CoA şi CO_2(ecuaţia 9.10), sinteza acidului palmitic necesită 8 molecule de acetil-CoA,14 NADPH şi 7 ATP.Acizii graşi se sintetizează în citosol,iar acetil-CoA se formează în mitocondrii din acid piruvic.Deoarece membrana mitocondrială internă este impermeabilă pentru acetil-CoA,trans-

portul direct al acestui compus nu s-a descoperit. Radicalii acetil sînt transferați din mitocondrii de către citrat, care se formează în matrixul mitocondrial prin condensarea acetil-CoA și acidului oxalilacetic. Apoi, acidul citric difuzează în citosol, unde este convertit la acetil-CoA sub acțiunea ATP-citratliazei (ecuația 9.13).

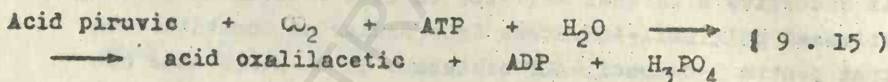


$$\text{Acid citric} + \text{ATP} + \text{CoA} \longrightarrow \text{acetil-CoA} + \text{acid oxalilacetic} + \text{ADP} + H_3PO_4 \quad (9.13)$$

Acidul oxalilacetic format, în urma transferului radicalilor acetil în citosol, trebuie să se reîntoarcă în mitocondrii. Membrana mitocondrială internă nu este penetrată de acidul oxalilacetic. Celula vie rezolvă această situație, folosind reacțiile catalizate de două enzime citosolice: malatdehidrogenaza NAD-dependentă și malatenzima NADP-dependentă) ecuația 9.14).



Acidul piruvic format pe această cale difuzează în mitocondrii, unde este carboxilat la acid oxalilacetic de piruvatcarboxilază (ecuația 9.15).



$$\text{Acid piruvic} + CO_2 + \text{ATP} + H_2O \longrightarrow \text{acid oxalilacetic} + \text{ADP} + H_3PO_4 \quad (9.15)$$

Ca rezultat final al celor trei reacții se realizează conversia NADH în NADPH, care este necesar pentru sinteza acizilor grași. Restul cantității de NADPH necesar pentru acest proces provine din calea pentozofosfaților.

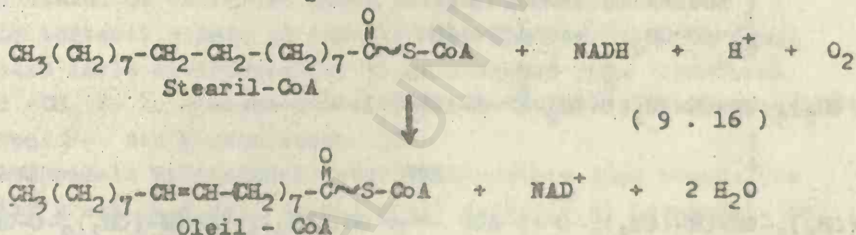
Acid gras sintetazele drojdiilor și mamiferelor constau din două tipuri de lanțuri polipeptidice, fiecare din ele fiind o proteină multifuncțională în care diferite enzime sînt legate covalent. Fiecare lanț polipeptidic este codificat de o singură genă. La plante și majoritatea bacteriilor acid gras sintetazele reprezintă un complex multienzimatic disociabil.

<u>Biosinteza acizilor grași nesaturați</u>. Produsul major al sintezei acizilor grași este acidul palmitic. Din acesta se formează

alţi acizi graşi saturaţi şi nesaturaţi.Creşterea sau scurtarea catenei carbonice a acizilor graşi saturaţi are loc pe calea adiţiei sau pierderii unui fragment C_2,sub acţiunea sistemelor enzimatice asociate cu membrana reticulului endoplasmatic,denumite încă <u>sisteme microsomale</u>.Aceste sisteme catalizează,de asemenea, introducerea dublelor legături în catenele lungi ale acil-CoA.

Cercetările efectuate cu izotopi radioactivi au arătat că în organismul mamiferelor se sintetizează numai acizi graşi cu o singură dublă legătură.Sinteza acizilor graşi nesaturaţi cu două sau mai multe duble legături se descoperă în plante şi microorganisme.

Inserţia dublei legături poate decurge aerob sau anaerob. Sistemul microsomal aerob al ţesuturilor animale catalizează sinteza acizilor graşi mononesaturaţi după un mecanism în care o oxidază întrebuinţează O_2 şi NADH sau NADPH(ecuaţia 9.16).



$$CH_3(CH_2)_7-CH_2-CH_2-(CH_2)_7-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim S-CoA \quad + \quad NADH \quad + \quad H^+ \quad + \quad O_2$$
Stearil-CoA

$$\downarrow \qquad (9.16)$$

$$CH_3(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim S-CoA \quad + \quad NAD^+ \quad + \quad 2\,H_2O$$
Oleil - CoA

Prin combinarea reacţiilor de elongaţie şi desaturare acidul oleic poate fi elongat la un acid gras cis-Δ^{11}-$C_{20:1}$.In mod similar,acidul palmitic se oxidează la acidul palmitoleic(cis-Δ^9-$C_{16:1}$),care poate fi transformat în acid cis-vaccenic(cis-Δ^{11}-$C_{18:1}$).

In sistemul aerob al unor microorganisme participă O_2,NADPH şi stearil-ACP.La plante sinteza acizilor palmitoleic şi oleic se desfăşoară în condiţii aerobe.

La bacteriile anaerobe(<u>Pseudomonas</u>,<u>Lactobacillus</u>) acizii monoetilenici se formează după un mecanism în care dubla legătură se introduce în etapele mai timpurii ale sintezei,de obicei cînd catena conţine 8-12 atomi de carbon.Succesiunea reacţiilor cuprinde formarea β-hidroxiacil-ACP cu catenă medie,apoi dehidratarea derivatului β-hidroxilat conducînd la cis-β,γ-dehidroacil-ACP.In acest caz legătura dublă nu se reduce,aşa cum se întîmplă

în sinteza acizilor graşi saturaţi.Intermediarul β,γ-nesaturat se condensează cu malonil-ACP,obţinîndu-se în final,de exemplu,acidul cis-vaccenic(fig.9.11).Celulele de E.coli conţin cîteva β-hidroxiacil-ACP dehidraze diferite a căror specificitate este determinată de lungimea catenei.

$CH_3(CH_2)_6-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim S-ACP$ → → → $CH_3(CH_2)_6-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim S-ACP$

Octanoil-ACP β-Cetodecanoil-ACP

↓ + NADPH

$CH_3(CH_2)_5-CH_2-\underset{OH}{\underset{|}{CH}}-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim S-ACP$

β-Hidroxidecanoil-ACP

← Dehidraza (H_2O)

$CH_3(CH_2)_5-CH=CH-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim S-ACP$

β,γ-Decenoil-ACP

↓ $HOOC-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim S-ACP$

Enzima de condensare

→ CO_2 + $ACP\sim SH$

$CH_3(CH_2)_5-CH=CH-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim S-ACP$

↓ ↓ ↓

$CH_3(CH_2)_5-CH=CH-(CH_2)_9-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim S-ACP$ —(HOH; ACP-SH)→ $CH_3(CH_2)_5-CH=CH-(CH_2)_9-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-OH$

Vaccenil-ACP Acid cis-vaccenic

Fig.9.11.Biosinteza unui acid gras cu o dublă legătură în condiţii anaerobe.

In ţesuturile animale se întîlnesc numeroşi acizi graşi polinesaturaţi.Doi din aceşti acizi,anume acidul linoleic(cis-Δ^9,Δ^{12}-$C_{18:2}$) şi acidul linolenic(cis-Δ^9,Δ^{12},Δ^{15}-$C_{18:3}$) nu pot fi sintetizaţi de mamifere,însă ei se formează în plante.Acizii linoleic şi linolenic sînt cunoscuţi ca acizi graşi esenţiali,ceea ce înseamnă că organismul animal îi primeşte din hrană.

Animalele superioare posedă sisteme enzimatice capabile să convertească acizii linoleic şi linolenic,de asemenea,acizii palmitoleic şi oleic în patru grupe de acizi graşi nesaturaţi care, în dependenţă de numărul grupelor $-CH_2-$ între grupa $-CH_3$ terminală şi cea mai apropiată dublă legătură,se clasifică în :

familia acidului oleic : $CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-R$

familia acidului palmitoleic : $CH_3-(CH_2)_5-CH=CH-R$
familia acidului linoleic : $CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-R$
familia acidului linolenic : $CH_3-CH_2-CH=CH-R$.
Acizii graşi cu una sau mai multe duble legături conferă membranelor biologice elasticitatea necesară şi servesc ca precursori ai altor componenţi celulari.

Biosinteza hidroxiacizilor şi acizilor graşi cu catenă ramificată.α-Hidroxiacizii graşi,de exemplu acidul cerebronic(acid α-hidroxilignoceric),care sînt componenţi ai lipidelor din creier, se sintetizează pe calea oxidării acizilor graşi superiori.Alţi hidroxiacizi graşi,în care grupa -OH este localizată mai spre centrul catenei,se formează prin hidratarea acizilor nesaturaţi. Acidul ricinoleic(12-hidroxioleic),identificat în uleiul de ricin şi uleiul de castor,se poate forma din oleil-CoA.

La bacterii,plante şi insecte s-au descoperit acizi graşi conţinînd inele ciclopropanice.Ei se formează prin transferul grupei $-CH_3$ de la S-adenozilmetionină la dubla legătură a acizilor graşi β- sau γ-mononesaturaţi.

Membranele microorganismelor se deosebesc după compoziţia în acizi graşi.In E.coli acizii graşi saturaţi şi nesaturaţi se găsesc în cantităţi aproximativ egale,în timp ce Bacillus subtilis şi Staphylococcus aureus conţin de două ori mai mulţi acizi graşi metil-ramificaţi decît acizi saturaţi.Acizii graşi ramificaţi se formează din produşii catabolismului unor aminoacizi ca valina,izoleucina şi leucina.Altă cale de biosinteză a acizilor graşi metil-ramificaţi o constituie metilarea acizilor graşi normali nesaturaţi cu ajutorul S-adenozilmetioninei.Astfel în Mycobacterium phlei acidul tuberculostearic(10-metilstearic) se obţine prin metilarea acidului oleic.Biogeneza acizilor graşi metil-ramificaţi se poate realiza şi plecînd de la propionil-CoA(prin intermediul metilmalonil-CoA).

O cantitate mare de acizi graşi ramificaţi atît liberi cît şi esterificaţi se găseşte între lipidele pielii omului.Se presupune că acizii graşi ramificaţi joacă un rol determinat în menţinerea echilibrului ecologic între microorganismele care populează pielea.In plus,aceste combinaţii conferă fiecărui individ mirosul specific,un fel de „amprentă digitală" chimică.

Reglarea biosintezei acizilor grași. Sinteza acizilor grași se desfășoară cu viteză maximă cînd glucidele sînt în exces și nivelul acizilor grași este coborît. Concentrația acidului citric în citosol este cel mai important reglator de scurtă durată al sintezei acizilor grași. După cum s-a menționat deja, acidul citric stimulează allosteric acetil-CoA carboxilaza, răspunzătoare de formarea malonil-CoA care este precursorul acizilor grași. Conținutul de acid citric este ridicat cînd acetil-CoA și ATP se găsesc în exces. Deci nivelul ridicat de acid citric indică că fragmentul C_2 și ATP pot fi utilizate pentru sinteza acizilor grași. Un efect antagonist acțiunii acidului citric asupra acetil-CoA carboxilazei exercită palmitil-CoA care se găsește din abundență cînd există un exces de acizi grași. Palmitil-CoA de asemenea inhibă transportul acidului citric din mitocondrii în citosol. In plus, palmitil-CoA inhibă generarea NADPH în reacția catalizată de glucozo-6-fosfat dehidrogenază.

Un mecanism de control cu acțiune lungă se bazează pe schimbarea vitezelor de sinteză și degradare a enzimelor implicate în metabolismul acizilor grași. Acest tip de reglare este cunoscut și sub numele de control adaptiv.

9.1.2.2. Biosinteza triacilglicerolilor

In organismele animale sinteza triacilglicerolilor (lipogeneza) se desfășoară cu preponderență în ficat și țesutul adipos. Plantele și numeroase microorganisme, de asemenea, posedă capacitatea de a sintetiza aceste lipide de rezervă.

Anabolismul triacilglicerolilor poate fi divizat în trei faze : (1) sinteza L-glicerol-3-fosfatului din dihidroxiacetonfosfat sau glicerol, (2) acilarea L-glicerol-3-fosfatului în diacilglicerol și (3) conversia diacilglicerolului în triacilglicerol.

L-Glicerol-3-fosfatul, reprezentînd forma activă a glicerolului, se poate sintetiza în celula vie pe căi diferite. Sursa majoră de L-glicerol-3-fosfat pentru sinteza triacilglicerolilor o constituie reducerea stereospecifică a dihidroxiacetonfosfatului, sub acțiunea glicerol-3-fosfat dehidrogenazei NAD-dependente (ecuația 9.1, reacția B): dihidroxiacetonfosfat + NADH + H^+ $\rightleftharpoons$



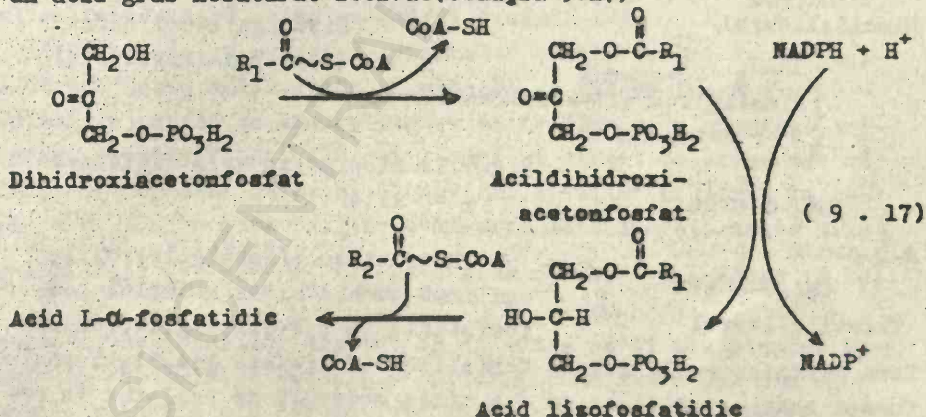
$\rightleftharpoons$ L-glicerol-3-fosfat + NAD^+ .

Alternativ, glicerolul poate fi fosforilat în prezenţa ATP de către glicerolkinază (ecuaţia 9.1, reacţia A) :


Glicerol + ATP ⟶ L-glicerol-3-fosfat + ADP.

Acilarea L-glicerol-3-fosfatului se realizează cu derivaţii acil-CoA, nu cu acizii graşi liberi. Deci acizii graşi trebuiesc activaţi înainte de a fi încorporaţi în glicerol-lipide. Reacţia de activare a acizilor graşi este catalizată de o acil-CoA sintetază fixată la reticulul endoplasmatic. Această enzimă cunoscută ca acil-CoA sintetaza I, poate lucra cu substrate avînd 14-18 atomi de carbon şi orice grad de nesaturare.

In prezenţa glicerolfosfat-aciltransferazei, L-glicerol-3-fosfatul reacţionează cu o moleculă de acil-CoA, rezultînd monoacilglicerolfosfatul (acidul lizofosfatidic). Acesta este din nou acilat de altă moleculă de acil-CoA cu formarea diacilglicerolfosfatului (acidului L-α-fosfatidic), reacţie catalizată de lizofosfatidat-aciltransferază (fig.9.12). In ficat s-a evidenţiat şi altă cale de sinteză a acidului fosfatidic, cuprinzînd transferul unui radical acil la dihidroxiacetonfosfat şi reducerea ulterioară a grupei cetonice, iar apoi acilarea acidului lizofosfatidic cu un acid gras nesaturat activat (ecuaţia 9.17).



La Clostridium butyricum şi E.coli acizii lizofosfatidic şi fosfatidic se sintetizează din glicerol-3-fosfat şi acil-CoA.

Deşi diacilarea directă a glicerol-3-fosfatului are un caracter întîmplător, resturile de acizi graşi saturaţi de obicei se fixează în poziţia 1, iar a celor nesaturaţi în poziţia 2. Acilarea

succesivă prin intermediul dihidroxiacetonfosfatului dă molecule asimetrice, caracteristice pentru mulţi triacilgliceroli naturali şi glicerofosfatide.

Acidul L-α-fosfatidic se află în punctul de intersectare a metabolismului triacilglicerolilor şi metabolismului lipidelor complexe.

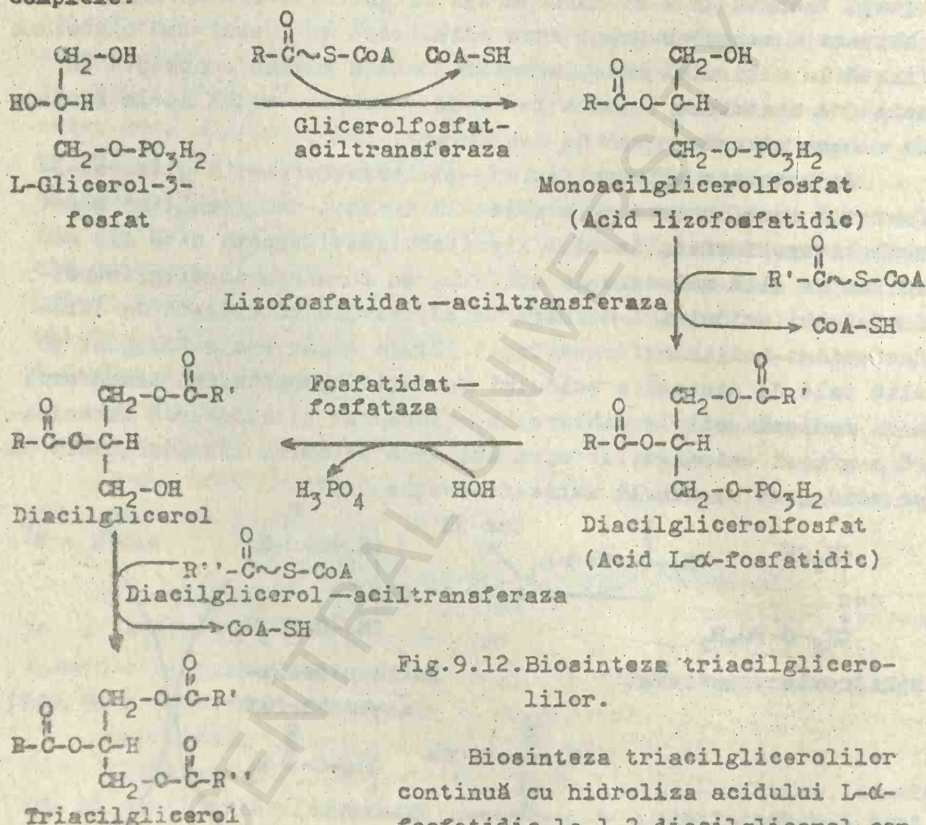


Fig.9.12.Biosinteza triacilglicerolilor.

Biosinteza triacilglicerolilor continuă cu hidroliza acidului L-α-fosfatidic la 1,2-diacilglicerol, conform reacţiei realizată de fosfatidat —fosfatază. Diacilglicerolul format este esterificat cu o a treia moleculă de acil-CoA în reacţia catalizată de diacilglicerol —aciltransferază care are ca produs final triacilglicerolul(fig.9.12).

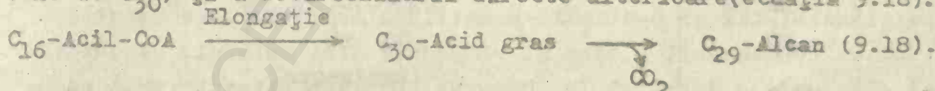
In epiteliul intestinal 2-monoacilglicerolii absorbiţi din hrană se esterifică direct cu două molecule de acil-CoA, transformîndu-se în triacilgliceroli.

Reglarea metabolismului triacilglicerolilor. Cel mai important mecanism de reglare a lipogenezei îl constituie activarea acetil-CoA carboxilazei de către acidul citric(vezi pg.194).Pe lîngă acesta,sinteza şi scindarea triacilglicerolilor care se acumulează în ficat şi ţesutul adipos,se află sub control hormonal.Aşa,adrenalina şi glucagonul,stimulînd formarea AMPc,determină activarea lipazelor,care hidrolizează triacilglicerolii.Pe de altă parte, insulina favorizează acumularea triacilglicerolilor;acest efect este condiţionat nu numai de intensificarea activităţii enzimelor lipogenezei şi în primul rînd a citrat-liazei,însă şi de inhibiţia formării AMPc şi ca urmare a reprimării lipolizei în celule.

9.2. METABOLISMUL CERIDELOR

Suprafeţele exterioare ale diferitelor organisme adesea sînt acoperite cu lipide specifice.De exemplu,în compoziţia unsorii secretate de glandele uropigiale ale raţelor şi gîştelor se găsesc pînă la 90% monoesteri ai diferiţilor acizi graşi,inclusiv acizi graşi metilramificaţi(9.1.2.1) cu 1-octadecanolul.Acest alcool se formează pe calea reducerii stearil-CoA.

Lipidele de pe suprafaţa plantelor conţin ceruri în compoziţia cărora intră acizi graşi şi alcooli cu catenă lungă din 10 - 30 atomi de carbon.In aceste ceruri se întîlnesc,de asemenea,acizi graşi neesterificaţi,alcooli liberi şi alcani.Se presupune că alcanii se formează pe calea elongaţiei acizilor C_{16}(pînă la catene de C_{30}) şi a decarboxilării directe ulterioare(ecuaţia 9.18).



$$C_{16}\text{-Acil-CoA} \xrightarrow{\text{Elongaţie}} C_{30}\text{-Acid gras} \xrightarrow[CO_2]{} C_{29}\text{-Alcan} \quad (9.18).$$

Sinteza hidrocarburilor are loc în diferite părţi ale plantei,inclusiv în cuticulă.De exemplu,n-heptanul constituie 98% din substanţele volatile ale terbentinei extrase din *Pinus jeffreyi*.

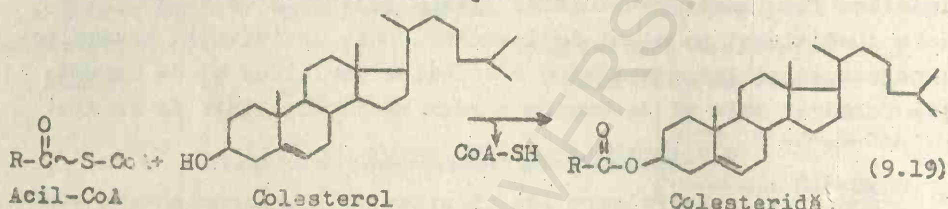
9.3. METABOLISMUL STERIDELOR

Steridele şi sterolii liberi există în toate organismele animale,unele plante şi microorganisme.Pentru om şi animalele superioare prezintă o importanţă deosebită colesterolul şi esterii lui cu acizii palmitic,stearic,oleic,linoleic şi linolenic.Esterii colesterolului luaţi de animale din hrană sînt hidroli-

zaţi în intestin în acizi graşi şi colesterol. Ultimul este absorbit şi parţial esterificat în celulele intestinale, de unde trece în chilomicronii limfei. Hidroliza şi formarea esterilor colesterolului (colesteridelor) se realizează sub acţiunea colesterolesterazei (hidrolaza esterilor sterolilor) care catalizează reacţia :


colesteridă + H_2O ⇌ colesterol + acid gras .

La nivelul ficatului biosinteza esterilor colesterolului se poate desfăşura, de asemenea, pe calea transferului direct al radicalului acil de la acil-CoA (ecuaţia 9.19).

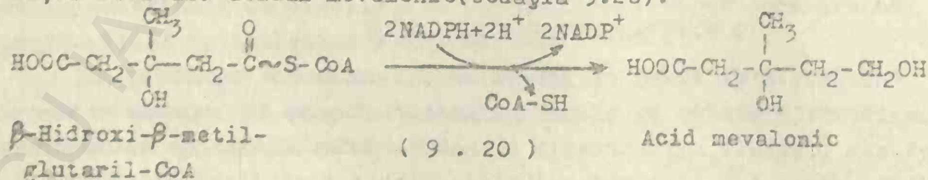


Acizii graşi din compoziţia sterideloг se metabolizează pe căile descrise anterior. In continuare se va trata anabolismul şi catabolismul sterolilor.

9.3.1. BIOSINTEZA STEROLILOR

In prezent cel mai bine studiată este biosinteza colesterolului. Prin utilizarea izotopilor radioactivi s-a stabilit că toţi atomii de carbon ai colesterolului provin din acidul acetic.

Prima etapă în sinteza colesterolului cuprinde formarea acidului mevalonic (acidului β,δ-dihidroxi-β-metilvalerianic) din acetil-CoA. In această secvenţă de reacţii apar ca intermediari acetilacetil-CoA şi β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA care rezultă pe calea condensării a două şi respectiv trei molecule de acetil-CoA, aşa cum s-a detaliat la formarea corpilor cetonici. Prin reducerea carboxilului esterificat al β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA, în reacţia catalizată de β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA reductază, se formează acidul mevalonic (ecuaţia 9.20).



β-Hidroxi-β-metilglutaril-CoA există atît în citosolul cît şi în mitocondriile hepatice. Cantitatea citoplasmatică a acestui intermediar furnizează acidul mevalonic pentru sinteza colesterolului. Se presupune că β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA reductaza reprezintă un important punct de control al sintezei colesterolului în ficat. Activitatea enzimei se diminuează după principiul feed back prin acumularea colesterolului şi metaboliţilor lui.

In etapa următoare acidul mevalonic se transformă în <u>izopentenilpirofosfat</u>. Această transformare este condiţionată de trei fosforilări succesive ale acidului mevalonic cu ajutorul ATP, conducînd la acidul 3-fosfo-5-pirofosfomevalonic. Acest intermediar labil pierde CO_2 şi H_3PO_4 trecînd în izopentenilpirofosfat (fig. 9.13).

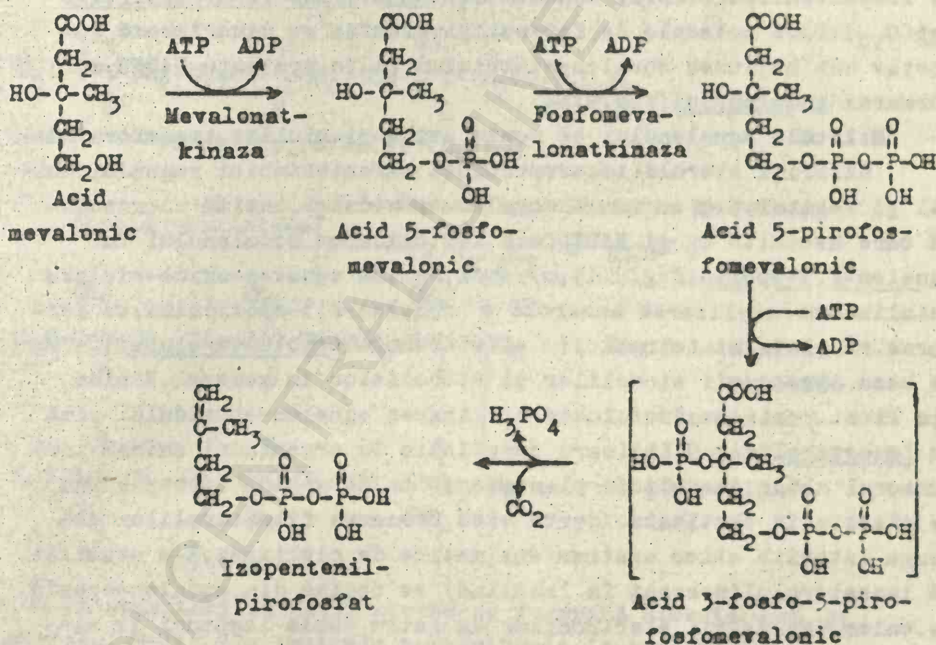
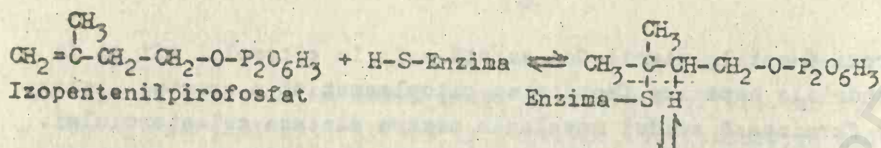
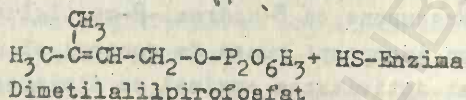


Fig.9.13. Sinteza izopentenilpirofosfatului din acid mevalonic .

Următoarea etapă în biosinteza colesterolului presupune izomerizarea izopentenilpirofosfatului în <u>3,3-dimetilalilpirofosfat</u>, sub aţiunea izopentenilpirofosfat-izomerazei (ecuaţia 9.21).





Izopentenilpirofosfatul şi dimetilalilpirofosfatul constituie formele active ale izoprenului şi servesc drept bază în sinteza terpenelor, carotenoidelor, steroidelor etc.

O moleculă de dimetilalilpirofosfat(C_5) şi o moleculă de izopentenilpirofosfat(C_5) se condensează dînd trans-geranilpirofosfatul(C_{10}). Reacţia dintre geranilpirofosfat şi o altă moleculă de izopentenilpirofosfat conduce la trans,trans-farnezilpirofosfat(C_{15}). Două molecule de farnezilpirofosfat se dimerizează reductiv sub acţiunea squalen-sintetazei şi în prezenţa NADPH, cu formarea squalenului(fig.9.14).

Molecula squalenului se poate oxida şi cicliza, transformîndu-diferiţi steroli(triterpenoide) caracteristici regnului animal şi vegetal. Sub acţiunea squalen-epoxidazei, enzimă microsomală care necesită O_2 şi NADPH, are loc oxidarea squalenului în squalen-2,3-epoxid(fig.9.15,a). Apoi, enzima squalen-oxido-ciclaza catalizează ciclizarea anaerobă a squalen-2,3-epoxidului, cu formarea scheletului tetraciclic al steranului(protosterolului), aflat la baza structurii sterolilor şi steroidelor în general. Enzima din ficat realizează exclusiv ciclizarea squalen-epoxidului pînă la lanosterol(fig.9.15), care constituie în organismul animal precursorul altor steroli. In plante, unde colesterolul lipseşte sau se găseşte în cantitate foarte mică, formarea fitosterolilor decurge datorită altor sisteme enzimatice de ciclizare. S-a stabilit că lanosterolul(prezent în lanolină) se obţine din squalen-epoxid pe calea deplasării electronilor în patru duble legături şi migrării a două grupe metil. Final, lanosterolul este transformat în colesterol printr-un proces complex care presupune eliminarea a trei grupe metil, glisarea dublei legături din poziţia 8,9 în poziţia 5,6 şi hidrogenarea dublei legături în catena laterală(fig.9.

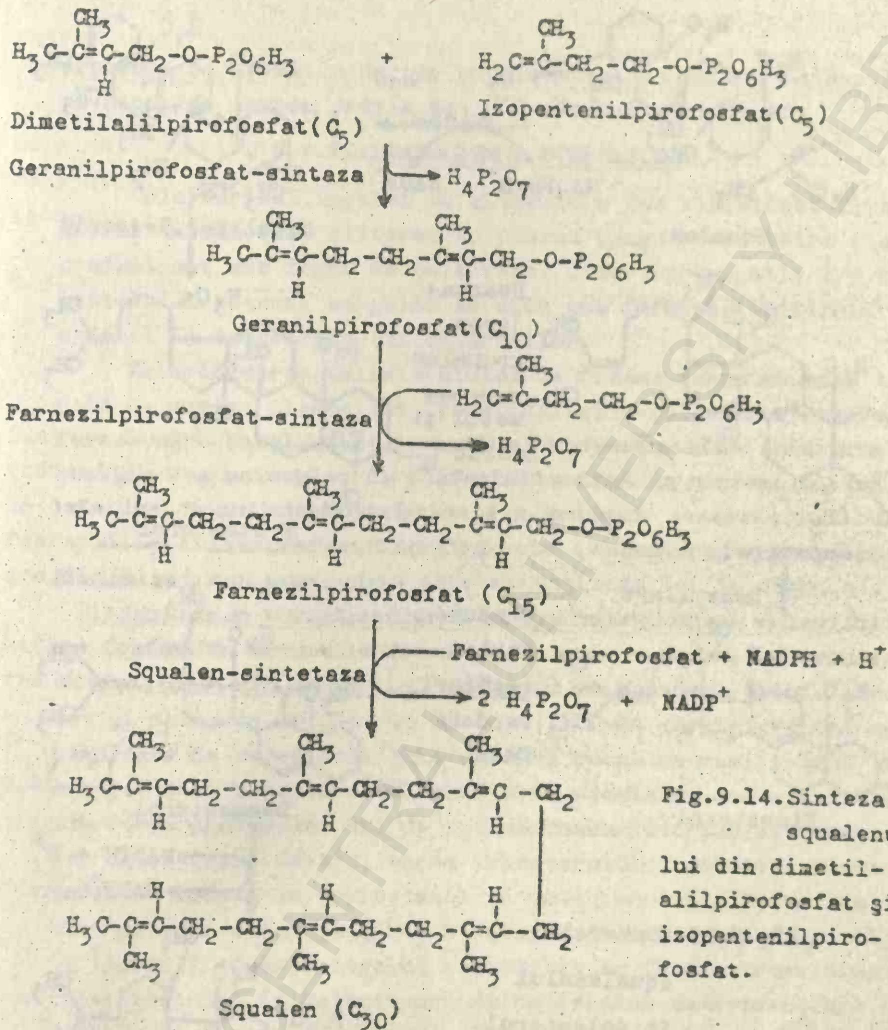


Fig.9.14.Sinteza squalenului din dimetilalilpirofosfat şi izopentenilpirofosfat.

9.15).Ca intermediari în acest proces se formează zimosterolul şi desmosterolul.Multe din enzimele participante la transformarea lanosterolului în colesterol sînt asociate cu membranele reticulului endoplasmatic.

Biosinteza colesterolului are loc în ficat,suprarenale,gonade,intestin,sistemul nervos,piele etc.Viteza de sinteză a colesterolului în organismul animal depinde de vîrsta şi sexul anima-

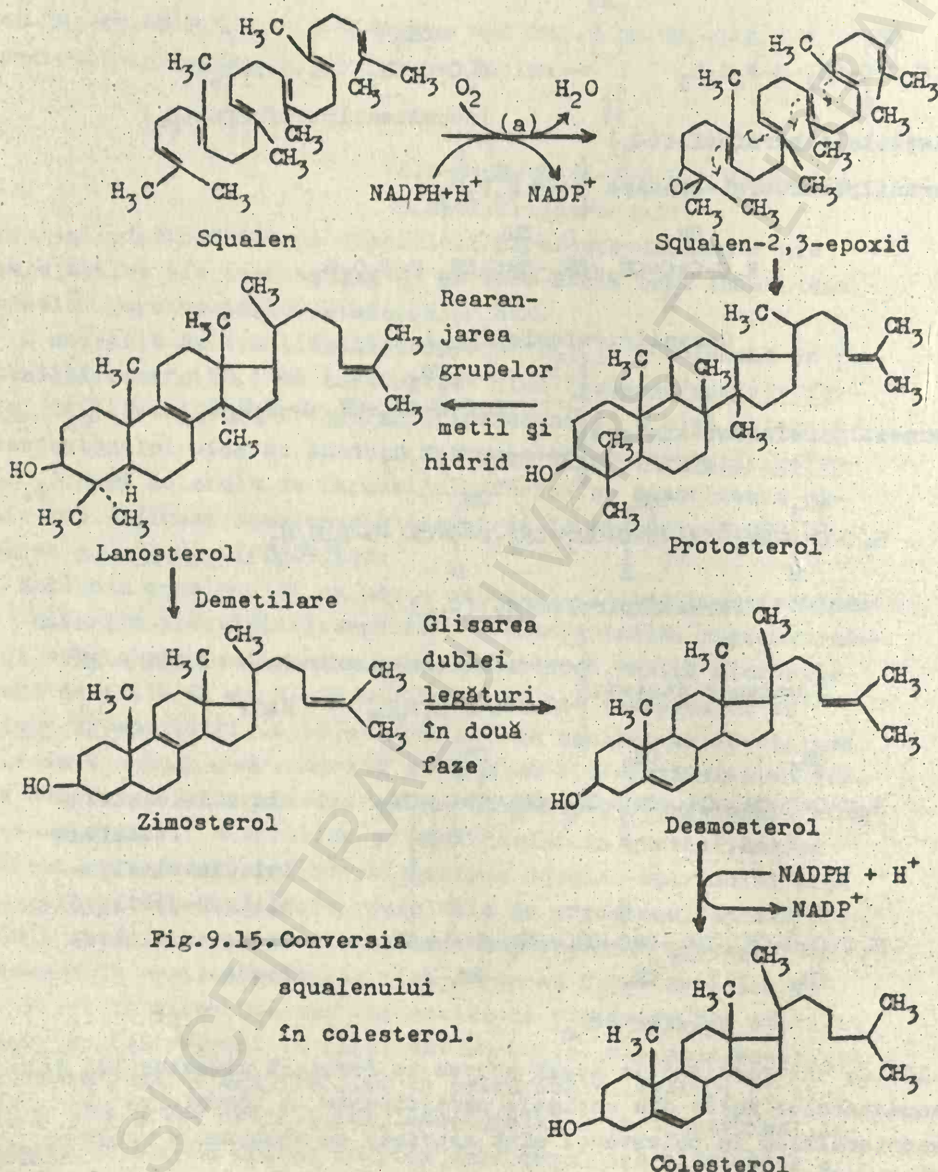


Fig.9.15. Conversia squalenului în colesterol.

lelor, natura hranei, sistemul endocrin şi alţi factori. Colesterolul se sintetizează cel mai intens în ficat.

Fitosterolii şi micosterolii se deosebesc de colesterol prin

prezența de atomi de carbon suplimentari în catena laterală.Acești atomi de carbon provin de la S-adenozilmetionină.

9.3.2, CATABOLISMUL STEROLILOR

Colesterolul,ingerat cu alimentele sau sintetizat în organismul animal,este eliberat în plasma sanguină de către ficat, predominant sub formă de colesterol liber.Aproximativ 2/3 din colesterolul plasmei sanguine se află sub formă esterificată,în special în compoziția chilomicronilor.

Esterificarea colesterolului în plasma sanguină este asigurată de enzima plasmatică fosfatidilcolin-colesterol—aciltransferaza,care catalizează transferul radicalului de acid gras din poziția 2 a moleculei de fosfatidilcolină la hidroxilul colesterolului: fosfatidilcolină + colesterol ⟶

⟶ lizofosfatidilcolină + colesterol esterificat.

Enzima mai sus menționată este sintetizată tot în ficat.

Din sînge colesterolul liber și colesterolul esterificat pot ajunge în tractul digestiv ca urmare a secreției prin mucoasa peretelui intestinal,de asemenea,cu ajutorul bilei.Intre ficat și intestin are loc un circuit,în urma căruia cea mai mare cantitate de colesterol este readusă pe calea venei porte la ficat și numai o parte se elimină prin fecale ca atare,dar mai ales sub forma produșilor lui de transformare datorită microorganismelor intestinale.Catabolizarea colesterolului de către flora bacteriană conduce la coprostanol și colestanol(fig.9.16).Aceștia sînt steroli saturați și nu se absorb din intestin,fiind eliminați împreună cu colesterolul neabsorbit în fecale.Transformarea colesterolului în colestenonă și colestanol se evidențiază de asemenea,în ficat.

Mult mai importantă este catabolizarea colesterolului în alte substanțe,între care acizii biliari și hormonii steroidici.

Conversia colesterolului în acizi biliari.Formarea acizilor biliari din colesterol constituie calea majoră de degradare a lui în organismul mamiferelor.Biosinteza acizilor biliari din colesterol se produce în ficat conform reacțiilor date în fig.9.17. Mai întîi are loc α-hidroxilarea atomului C-7,apoi îndepărtarea dublei legături,urmată de hidroxilarea C-12,conducînd la formarea

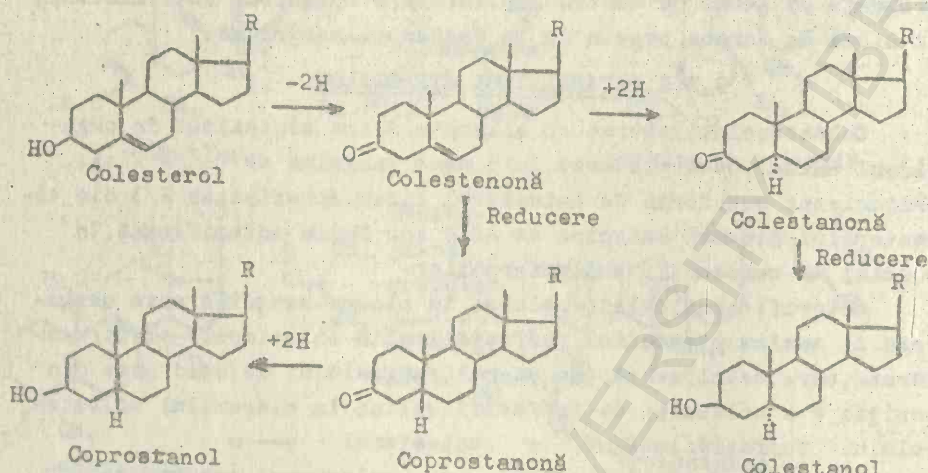
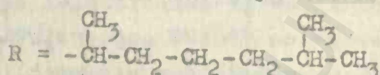


Fig.9.16.Catabolizarea colesterolului la coprostanol și colestanol sub acțiunea florei intestinale.



3α,7α,12α-trihidroxicoprostanului.Ultimul intermediar se transformă prin hidroxilare și β-oxidare la catena laterală în colil-CoA.Acizii biliari activați reacționează cu glicocolul sau taurina,obținîndu-se <u>acizii biliari conjugați</u> corespunzători.Astfel de la colil-CoA rezultă acidul glicocolic și acidul taurocolic (ecuația 9.22).Sărurile de sodiu ale acizilor biliari conjugați, denumite încă <u>săruri biliare</u>,reprezintă emulgatori puternici,întrucît conțin regiuni polare și nepolare în moleculele lor.

Din ficat sărurile biliare pătrund în vezicula biliară și prin intermediul ei sînt eliberate în intestinul subțire.Sărurile biliare,constituientul major al bilei,condiționează emulsionarea foarte fină a lipidelor,facilitînd absorbția acestora din lumenul intestinal.O parte a sărurilor biliare excretate în intestinul subțire suferă diferite transformări biochimice.La nivelul mucoasei intestinale acizii biliari simpli și conjugați se resorb în proporție ridicată și prin vena portă ajung din nou în ficat.Acest circuit al acizilor biliari este denumit <u>ciclul enterohepatic</u> și are implicații în buna funcționare a ficatului

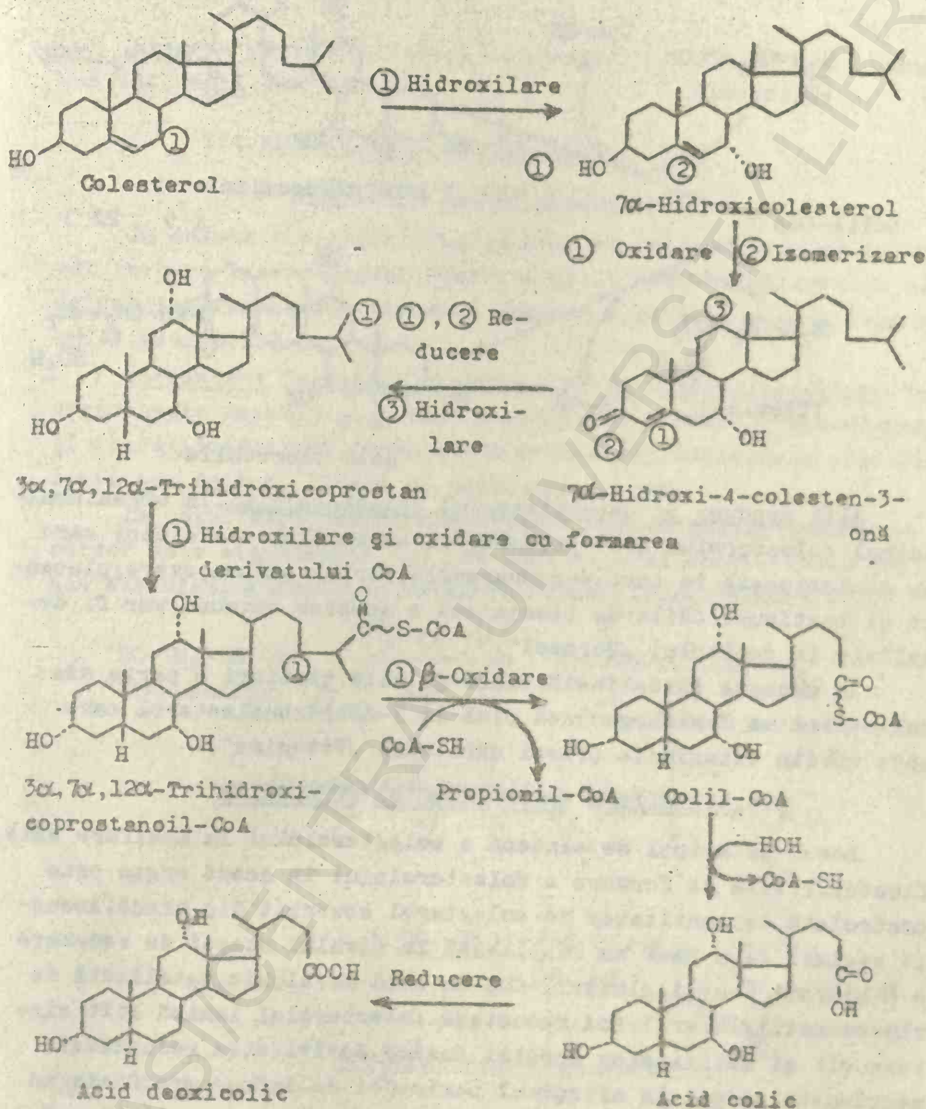
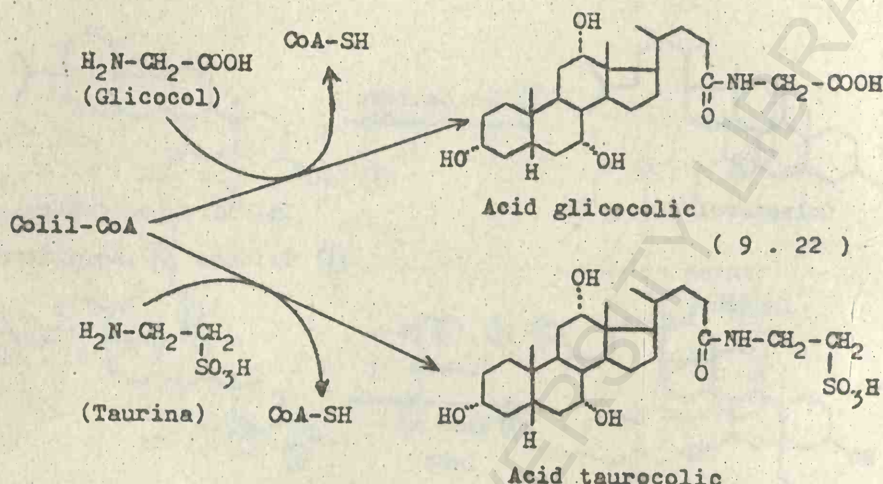


Fig.9.17.Biosinteza acizilor biliari.

şi a veziculei biliare.Alături cu acidul colic în ciclul entero-hepatic se integrează,de asemenea,sub formă de săruri biliare, acidul deoxicolic care este produs de microorganismele intestinale.



(9 . 22)

<u>Alţi produşi ai catabolismului colesterolului</u>. In organismul animal colesterolul este precursorul hormonilor steroidici care se sintetizează în corticosuprarenală, corpul galben, ovare, placentă şi testicule. Căile de biosinteză a acestor hormoni vor fi detaliate în capitolul „Hormoni".

In mucoasa intestinală, piele şi alte ţesuturi o parte din colesterol se dehidrogenează pînă la 7-dehidrocolesterol care este una din vitaminele D(vezi capitolul „Vitamine").

9.3.3. REGLAREA METABOLISMULUI STEROLILOR

Locul principal de sinteză a colesterolului la mamifere este ficatul. Viteza de formare a colesterolului în acest organ este controlată de cantitatea de colesterol absorbit din hrană. Această reglare feed back se realizează la nivelul etapei de reducere a β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA în acid mevalonic, catalizată de hidroximetilglutaril-CoA reductază. Colesterolul inhibă atît sinteza cît şi activitatea acestei enzime. Activitatea reductazei menţionate creşte la sfîrşitul perioadei de înfometare. Dieta cu un conţinut ridicat în glucide sau triacilgliceroli stimulează sinteza colesterolului din acetil-CoA.

Efectul feed back al colesterolului din hrană se exercită de asemenea asupra ciclizării squalenului în lanosterol.

Sinteza şi catabolizarea colesterolului se află,de asemenea, sub influenţa unor hormoni.

9.4.METABOLISMUL GLICEROFOSFATIDELOR

9.4.1.BIOSINTEZA GLICEROFOSFATIDELOR

In celula vie glicerofosfatidele se sintetizează pe diferite căi în care intermediarul poate să fie 1,2-diacilglicerolul sau acidul L-α-fosfatidic.Formarea acestor substanţe a fost deja descrisă(vezi 9.1.2.2).

Biosinteza fosfatidiletanolaminei şi fosfatidilcolinei.In organismele animale şi plante anabolismul fosfatidiletanolaminei şi fosfatidilcolinei presupune o prealabilă activare a etanolaminei sau colinei libere cu participarea ATP.

In cazul biosintezei fosfatidiletanolaminei,al cărui precursor este etanolamina,are loc fosforilarea acesteia sub acţiunea etanolaminkinazei,cu formarea fosforiletanolaminei(fig.9.18,a).

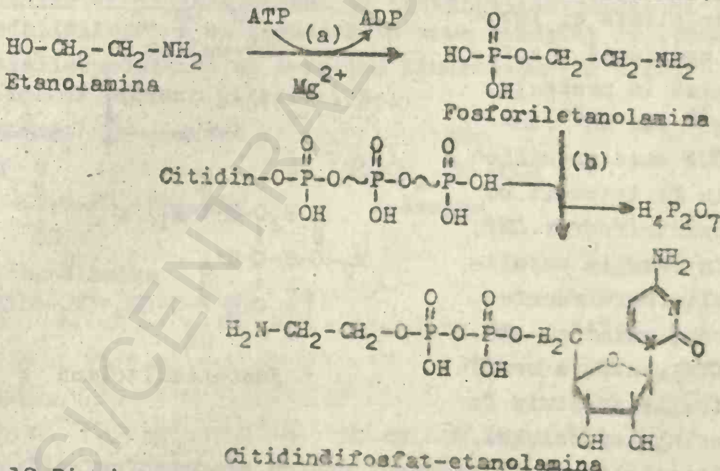
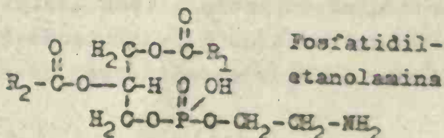


Fig.9.18.Biosinteza fosfatidiletanolaminei.

(a) - etanolaminkinaza

(b) - etanolaminfosfat--citidililtransferaza

(c) - etanolaminfosfotransferaza



Fosfatidiletanolamina

Apoi, fosforiletanolamina reacţionează cu citidintrifosfatul(CTP), rezultînd citidindifosfatetanolamina(CDP-etanolamina)(fig.9.18,b). Restul de fosforiletanolamină al CDP-etanolaminei este transferat la 1,2-diacilglicerol cu formarea fosfatidiletanolaminei şi citidinmonofosfatului(C (fig.9.18,c).

Fosfatidilcolina se sintetizează după o cale asemănătoare, care este redată în fig.9.19.

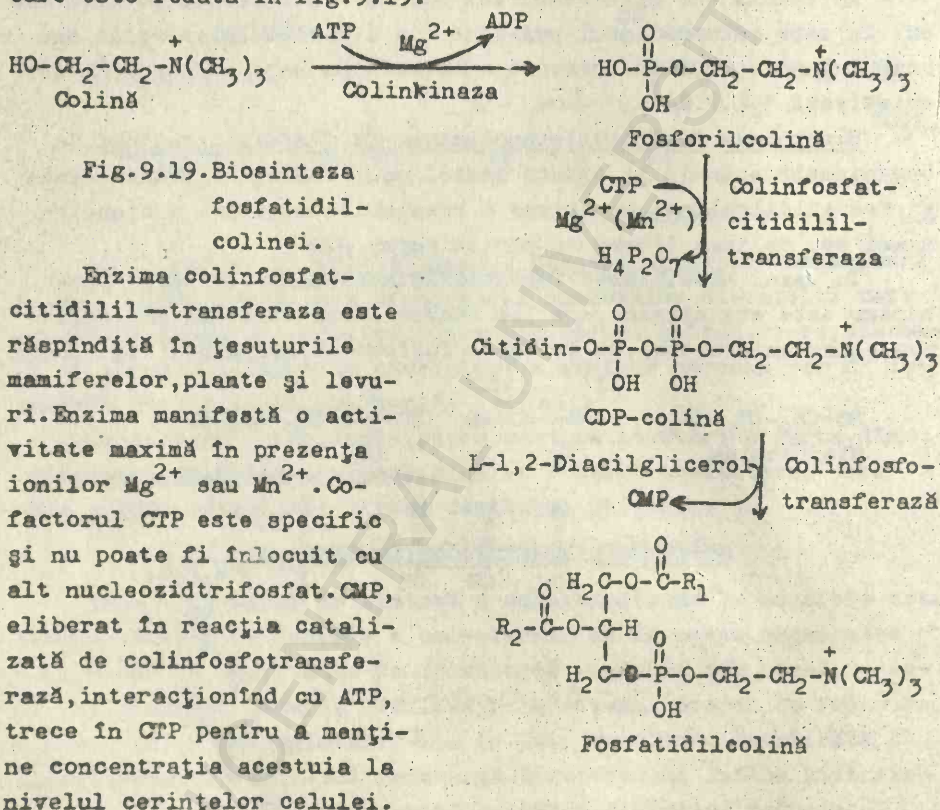
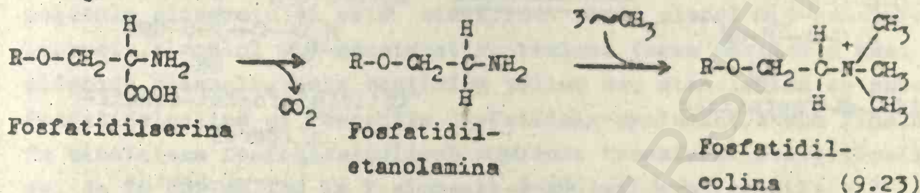


Fig.9.19.Biosinteza fosfatidilcolinei.

Enzima colinfosfatcitidilil—transferaza este răspîndită în ţesuturile mamiferelor, plante şi levuri. Enzima manifestă o activitate maximă în prezenţa ionilor Mg^{2+} sau Mn^{2+}. Cofactorul CTP este specific şi nu poate fi înlocuit cu alt nucleozidtrifosfat. CMP, eliberat în reacţia catalizată de colinfosfotransferază, interacţionînd cu ATP, trece în CTP pentru a menţine concentraţia acestuia la nivelul cerinţelor celulei.

1,2-Diacilglicerolii necesari pentru sinteza fosfatidiletanolaminei şi fosfatidilcolinei se pot forma din triacilgliceroli sau în urma hidrolizei acidului fosfatidic(vezi 9.1.2.2.). Ultima cale predomină, întrucît glicerofosfatidele mamiferelor şi plantelor, de obicei conţin în calitate de R_1 un acid gras saturat, iar în calitate de R_2 - un acid gras nesaturat.

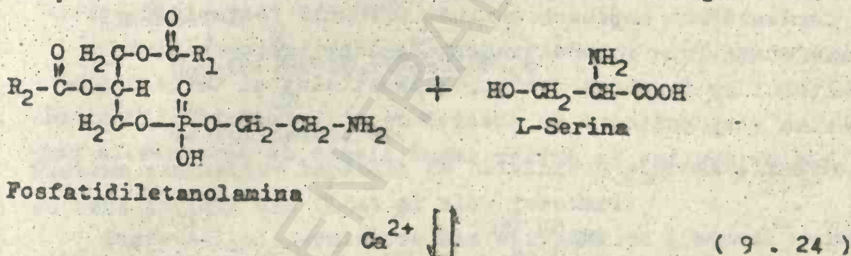
Există şi alte căi de sinteză a celor două tipuri de glicerofosfatide. Astfel, decarboxilarea fosfatidilserinei sub acţiunea fosfatidilserin-decarboxilazei, enzimă piridoxalfosfat-dependentă, prezentă în plante şi alge, conduce la fosfatidiletanolamină. Grupa aminică a fosfatidiletanolaminei poate fi metilată în trei etape cu ajutorul S-adenosilmetioninei pentru a forma fosfatidilcolina (ecuaţia 9.23).



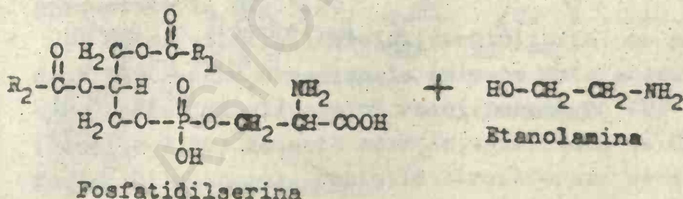
(9.23)

Sinteza fosfatidilcolinei în reacţia de transmetilare treptată a fosfatidiletanolaminei a fost dovedită pentru creier şi ficat. Unele date despre introducerea gradată a grupelor metil în molecula fosfatidiletanolaminei au fost obţinute la Neurospora, Agrobacteria, drojdii, alge şi plante.

Biosinteza fosfatidilserinei şi fosfatidilinozitolilor. La mamifere fosfatidilserina se formează în urma reacţiei de schimb între fosfatidiletanolamină şi L-serina liberă (ecuaţia 9.24).

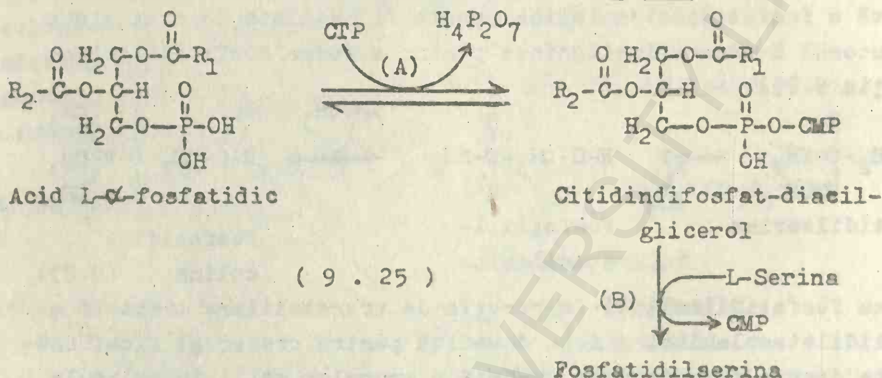


(9.24)



La plante şi bacterii (E. coli şi altele) sinteza fosfatidilserinei începe cu interacţia dintre acidul L-α-fosfatidic şi CTP. In urma acestei reacţii catalizată de fosfatidat-citidililtrans-

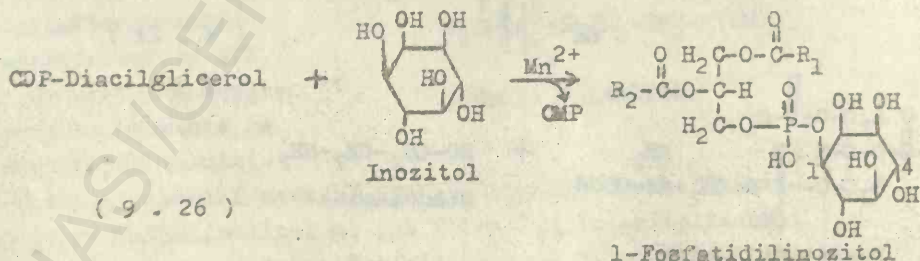
ferază rezultă citidindifosfat-diacilglicerolul(CDP-diacilglicerolul). Fosfatidilserin-sintaza realizează transferul restului de acid fosfatidic de la CDP-diacilglicerol la L-serină cu formarea fosfatidilserinei şi CMP(ecuaţia 9.25). La E.coli fosfatidilserina



(9 . 25)

se decarboxilează, sub acţiunea fosfatidilserin-decarboxilazei localizată în membrana celulară, rezultînd fosfatidiletanolamina, cum s-a indicat mai sus.

Fosfatidilinozitolii se sintetizează pe calea cuprinzînd CDP-diacilglicerolul(ecuaţia 9.25; etapa A), ca produs intermediar, care se formează sub acţiunea enzimei CTP: acid fosfatidic—citidililtransferaza. Prin interacţiunea CDP-diacilglicerolului cu mio-inozitolul se formează fosfatidilinozitolul şi CMP(ecuaţia 9.26). Enzima răspunzătoare de această reacţie, fosfatidilinozitol-sintaza s-a evidenţiat în creier, inimă, plante, de asemenea, la bacterii.

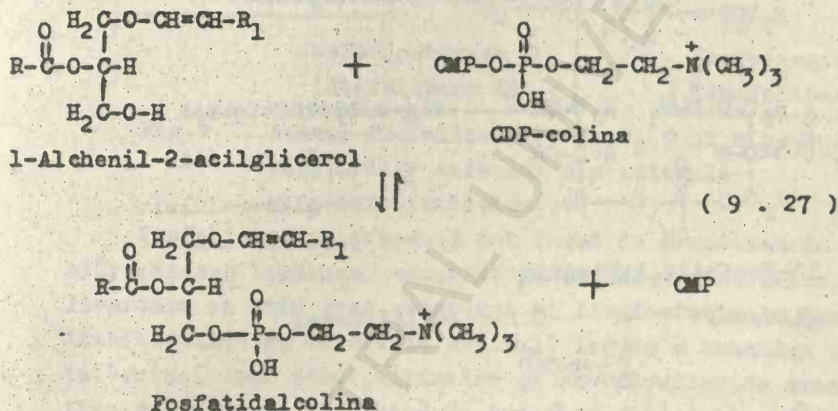


(9 . 26)

Formarea fosfatidilinozitolilor cu două şi trei resturi de acid fosforic are loc prin fosforilarea succesivă a fosfatidilinozitolului, mai întîi în poziţia 4, apoi în poziţia 5, de către

două kinaze specifice care necesită ATP şi Mg^{2+} (Mn^{2+}). Deosebit de bogate în fosfatidilinozitoldifosfat sînt membranele mielinice ale creierului şi sistemului nervos.

Biosinteza plasmalogenelor şi fosfatidilglicerolilor. Plasmalogenele sînt glicerofosfatide în care hidroxilul alcoolic 1 din molecula glicerolului este eterificat cu un alcool α,β-nesaturat. Intrucît, alcoolul α,β-nesaturat reprezintă forma enolică a unei aldehide, plasmalogenele conţinînd colină sau etanolamină se numesc fosfatidalcolină şi respectiv fosfatidaletanolamină. Etapa finală în biosinteza fosfatidalcolinei cuprinde transferul fosforilcolinei de la CDP-colină la 1-alchenil-2-acilglicerol (ecuaţia 9.27).

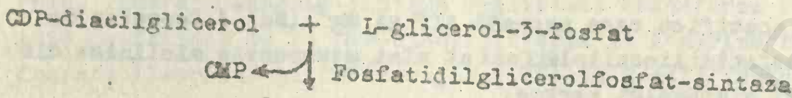


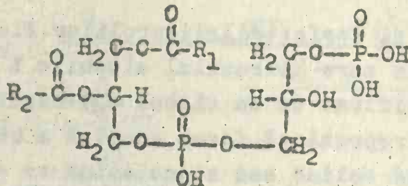
Sisteme enzimatice capabile să catalizeze sinteza plasmalogenelor au fost izolate din ficat şi alte ţesuturi.

Fosfatidilglicerolul se sintetizează cu ajutorul reacţiilor prezentate în fig.9.20.

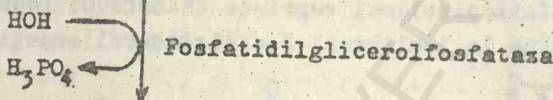
Difosfatidilglicerolul (cardiolipina) se poate sintetiza pe două căi. Pentru organismele animale este specifică varianta în care fosfatidilglicerolul reacţionează cu CDP-diacilglicerolul (ecuaţia 9.28). Această reacţie, catalizată de CDP-diacilglicerol: fosfatidilglicerol—fosfatidiltransferaza, se desfăşoară în membrana internă a mitocondriilor. Cardiolipina constituie 10% şi mai mult din lipidele membranei mitocondriale.

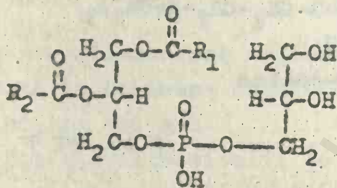
Bacteriile sintetizează cardiolipina după un alt procedeu. Din celulele de S. aureus a fost izolată enzima cardiolipinsinte-





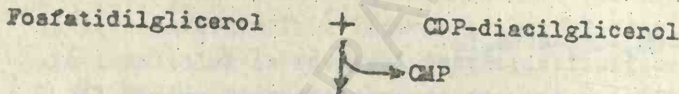
3'-Fosfatidilglicerol-1'-fosfat

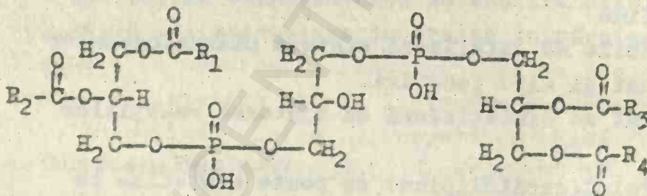




3'-Fosfatidilglicerol

Fig.9.20.Biosinteza fosfatidilglicerolului.

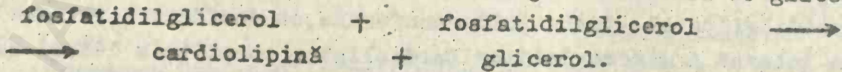




(9 . 28)

Difosfatidilglicerol(Cardiolipina)

taza care catalizează transformarea a două molecule de fosfatidilglicerol într-o moleculă de cardiolipină şi o moleculă de glicerol : fosfatidilglicerol + fosfatidilglicerol ⟶



⟶ cardiolipină + glicerol.

După această reacţie se realizează sinteza cardiolipinei şi la <u>E.coli</u>.

Pînă în prezent nu se cunoaşte care din cele două căi de biosinteză a cardiolipinei este specifică plantelor.

9.4.2. CATABOLISMUL GLICEROFOSFATIDELOR

Catabolismul glicerofosfatidelor are loc cu viteză apreciabilă în intestin şi ficat,iar cu viteză mai mică în rinichi etc.

Glicerofosfatidele sînt scindate în părţile componente sub acţiunea enzimelor denumite fosfolipaze.Corespunzător structurii glicerofosfatidelor sînt posibile patru reacţii de scindare a acestor fosfolipide,catalizate de patru enzime diferite(fig.9.21).

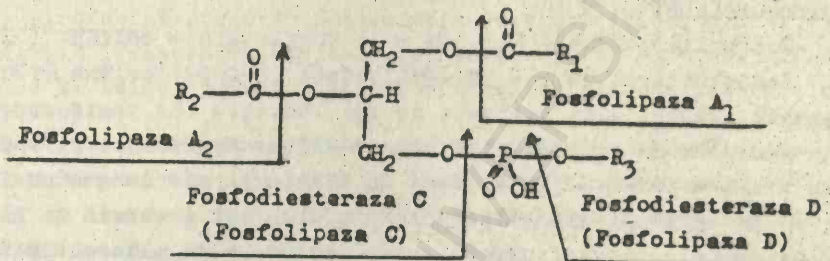
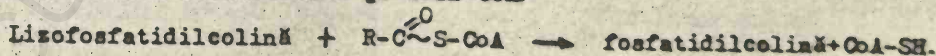


Fig.9.21.Atacul fosfolipazelor A_1,A_2,C şi D asupra legăturilor esterice din molecula glicerofosfatidelor.

Fosfolipaza A_2,prezentă sub formă de proenzimă în pancreas, hidrolizează legătura esterică β din glicerofosfatide,punînd în libertate un acid gras nesaturat şi lizofosfatidele.Denumirea de lizofosfatide se datoreşte acţiunii lor de a hemoliza eritrocitele.Veninul unor şerpi,albinelor şi scorpionilor,de asemenea,conţine fosfolipaza A_2 activă în prezenţa Ca^{2+}.Acţiunea fosfolipazei A_2 se exercită asupra fosfatidilcolinei,fosfatidiletanolaminei şi plasmalogenelor conţinînd colină sau etanolamină.

Fosfolipaza A_1 sau lizofosfolipaza catalizează scindarea hidrolitică a legăturii esterice α în molecula lizofosfatidilcolinei şi lizofosfatidilcolaminei.Ca produşi de reacţie rezultă acidul gras şi glicerolfosforilcolina sau glicerolfosforilcolamina. Enzima se găseşte în pancreas,ficat şi unele microorganisme (Aspergillus,Penicillium).

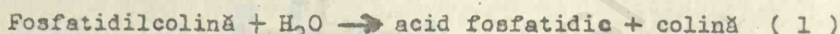
Alături cu fosfolipazele,în ţesuturile mamiferelor se întîlneşte o enzimă capabilă să catalizeze resinteza fosfatidilcolinei din lizofosfatidilcolină şi acil-CoA:



Lizofosfatidilcolină + $R-C(=O)\sim S-CoA \longrightarrow$ fosfatidilcolină+CoA-SH.

Fosfolipaza C sau fosfodiesteraza C scindează glicerofosfatidele în 1,2-diacilglicerol şi baza azotată fosforilată. Enzima este răspîndită în ţesuturile animale, plante şi α-toxina produsă de Clostridium.

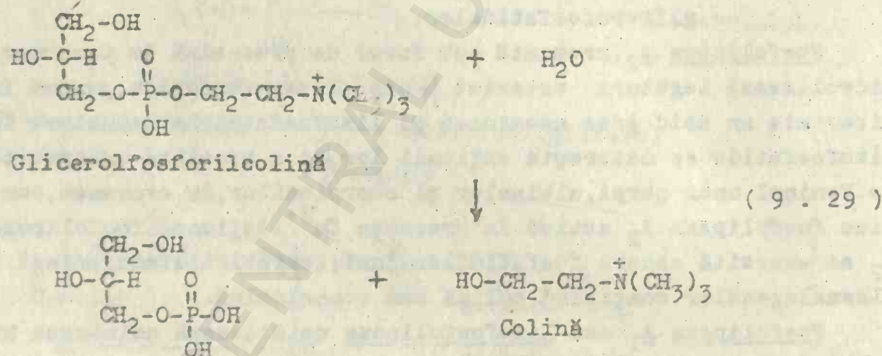
Fosfolipaza D (fosfodiesteraza D) poate cataliza hidroliza legăturii fosfodiesterice terminale (în poziţia D) în molecula glicerofosfatidelor conţinînd colină, etanolamină, serină şi glicerol, cu formarea acidului fosfatidic (1), precum şi transferul restului fosfatidil (2) :


Fosfatidilcolină + H_2O → acid fosfatidic + colină (1)


Fosfatidilcolină + R-OH → fosfatidil-O-R + colină (2).

Ambele reacţii sînt activate de Ca^{2+}. Reacţia (2) poate constitui un mecanism de sinteză şi schimb a glicerofosfatidelor. Fosfolipaza D a fost identificată numai în plante şi microorganisme.

In catabolismul glicerofosfatidelor mai intervin şi alte enzime. Astfel, glicerolfosforilcolindiesteraza catalizează hidroliza glicerolfosforilcolinei în glicerol-3-fosfat şi colină (ecuaţia 9.29).

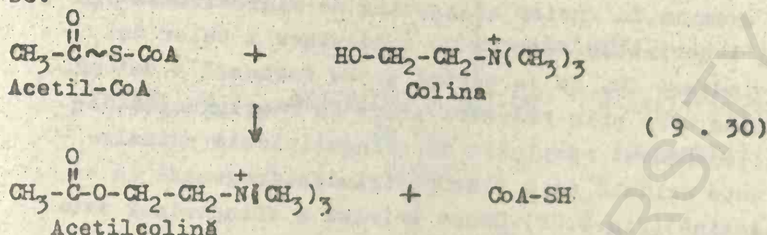


Enzima menţionată, răspîndită în diferite ţesuturi animale (ficat, creier) şi microorganisme atacă, de asemenea, glicerolfosforilcolamina.

Glicerol-3-fosfatul este hidrolizat de fosfomonoesterază. Fosfatidat-fosfataza scindează acidul fosfatidic, iar lipazele hidrolizează diacilglicerolii.

Colina participă la o serie de reacţii foarte importante

pentru celula vie.Astfel,în sistemul nervos colina este acetilată sub acţiunea colin-acetiltransferazei cu formarea acetilcolinei (ecuaţia 9.30) care intervine în transmiterea impulsurilor nervoase.



$$CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim S-CoA \quad + \quad HO-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3$$

Acetil-CoA — Colina

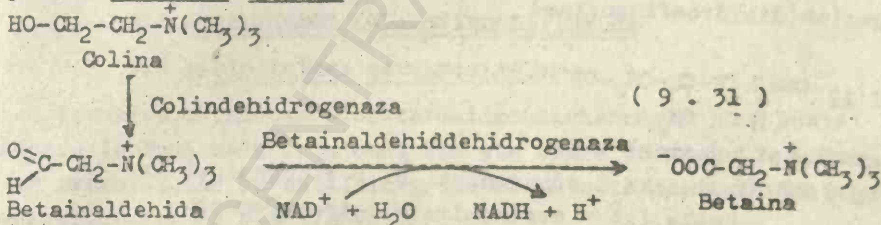
$$\downarrow \qquad (9.30)$$

$$CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3 \quad + \quad CoA-SH$$

Acetilcolină

Colin-acetiltransferaza se întîlneşte în toate formaţiunile sistemului nervos al vertebratelor şi nevertebratelor.Enzima din creierul de iepure a fost obţinută în stare pură şi caracterizată de Vlad Artenie(1966).

Altă posibilitate de metabolizare a colinei este oxidarea ei de către colindehidrogenază în betainaldehidă,care apoi se transformă sub acţiunea betainaldehiddehidrogenazei în betaină (ecuaţia 9.31).Betaina serveşte ca donor de grupe metil în reacţiile de transmetilare,de exemplu,în sinteza nornicotinei la planta Nicotiana rustica.



$$HO-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3$$

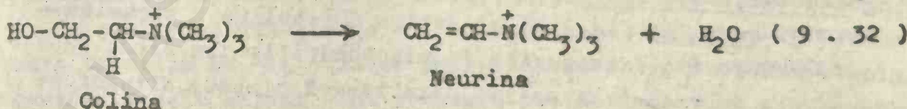
Colina

↓ Colindehidrogenaza (9.31)

$$O{=}C(H)-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3 \xrightarrow{\text{Betainaldehiddehidrogenaza}} {}^{-}OOC-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3$$

Betainaldehida — $NAD^+ + H_2O$ → $NADH + H^+$ — Betaina

Bacteriile de putrezire au un sistem enzimatic care dehidratează colina cu formarea neurinei(ecuaţia 9.32),substanţă deosebit de toxică.



$$HO-CH_2-\underset{H}{CH}-\overset{+}{N}(CH_3)_3 \longrightarrow CH_2{=}CH-\overset{+}{N}(CH_3)_3 + H_2O \qquad (9.32)$$

Colina — Neurina

9.5. ANABOLISMUL SFINGOFOSFATIDELOR

Sfingofosfatidele(sfingomielinele) sînt derivaţi ai sfingozinei(sfingeninei), aminoalcool alifatic cu catenă lungă. In ţesuturile animale, de exemplu, în creier sfingozina se sintetizează din palmitoil-CoA şi L-serină. In reacţia de condensare a celor doi precursori se scindează CO_2 de la serină şi se formează o cetonă, 3-dehidrosfinganina, care prin reducere trece în D-sfinganină(dihidrosfingozină), component răspîndit în sfingolipidele animalelor. Sfinganina este oxidată de o flavoproteindehidrogenază la sfingenină(sfingozină)(fig.9.22). Grupa aminică a sfingeninei este

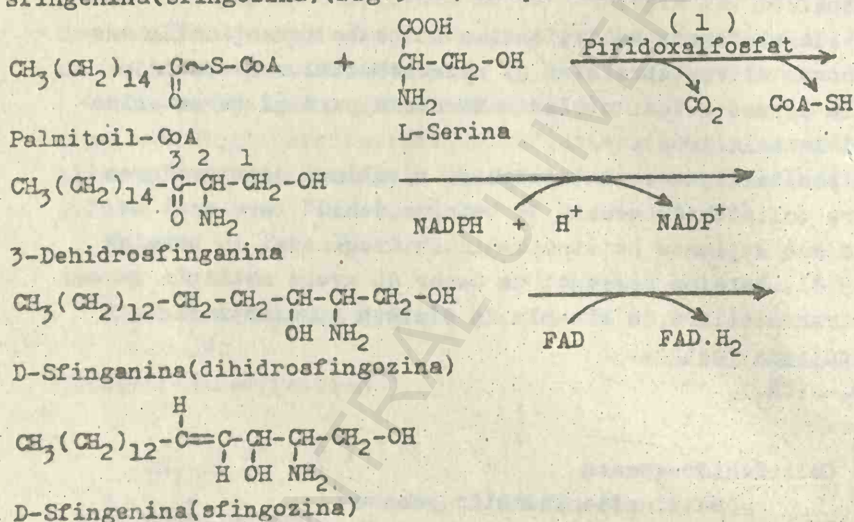


Fig.9.22. Biosinteza D-sfinganinei şi D-sfingeninei la animale. (1) - serinpalmitoil-transferaza.

acilată în toate sfingolipidele. Radicalii acil provin de la acil-CoA. In urma reacţiei dintre acil-CoA şi sfingozină, catalizată de 2-sfingozin-aciltransferază, se formează N-acilsfingozina, combinaţie numită şi ceramidă(fig.9.23,a). Enzima CDP-colina : ceramida — colinfosfotransferaza, descoperită în mitocondriile din ficat şi în omogenatele de creier şi splină, catalizează sinteza sfingofosfatidei din ceramidă şi CDP-colină(fig.9.23,b).

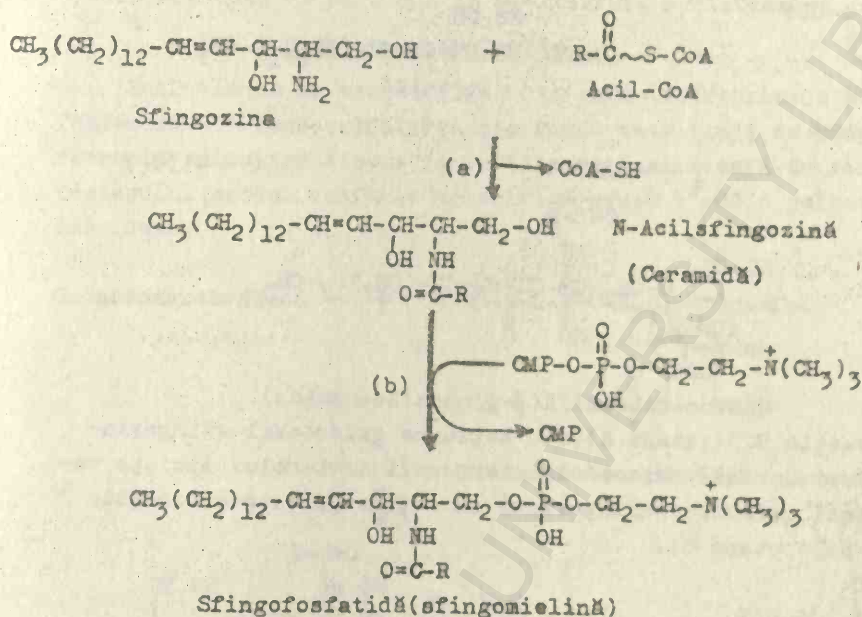


Fig.9.23.Biosinteza sfingofosfatidei cuprinde ca produs intermediar N-acilsfingozina(ceramida).

9.6.ANABOLISMUL GLICOSFINGOLIPIDELOR

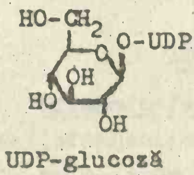
9.6.1.Biosinteza cerebrozidelor

Formarea cerebrozidelor(ceramidmonozaharidelor) se poate efectua în două moduri: în unul din ele apare ca produs intermediar ceramida,iar în celălalt prima etapă este glicozilarea sfingeninei,urmată de N-acilare.

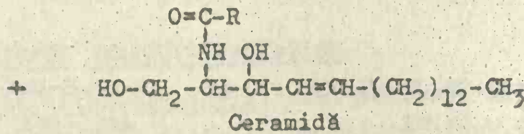
Galacto- şi gluco-cerebrozidele rezultă în reacţia ceramidei cu UDP-galactoza sau cu UDP-glucoza.Astfel,enzima ceramid—glucoziltransferaza,descoperită în creier,catalizează reacţia(9.33).

In creier se găseşte,de asemenea,ceramid—galactoziltransferaza capabilă să sintetizeze galactocerebrozida(β-galactozilceramida).Aceste enzime sînt prezente şi în ficat,însă posedă o activitate mai diminuată.

Conform celui de al doilea mod de sinteză a cerebrozidelor, mai întîi are loc transformarea sfingozinei în O-galactozilsfin-

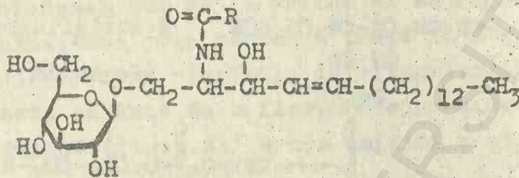


UDP-glucoză



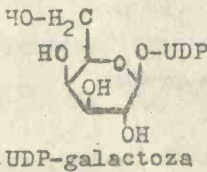
Ceramidă



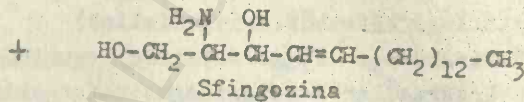


Glucocerebrozidă(β-glucozilceramida)

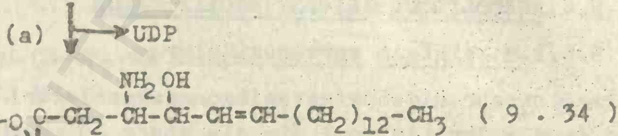
gozină(ecuaţia 9.34,etapa a),sub acţiunea galactozil-sfingozin-transferazei,enzimă prezentă în microsomii creierului.Apoi,pe calea acilării galactozilsfingozinei se obţine galactocerebrozida (ecuaţia 9.34,etapa b).



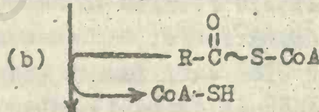
UDP-galactoza

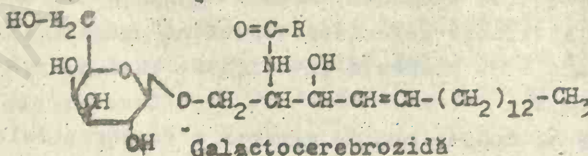


Sfingozina



O-Galactozilsfingozina(psihozina)



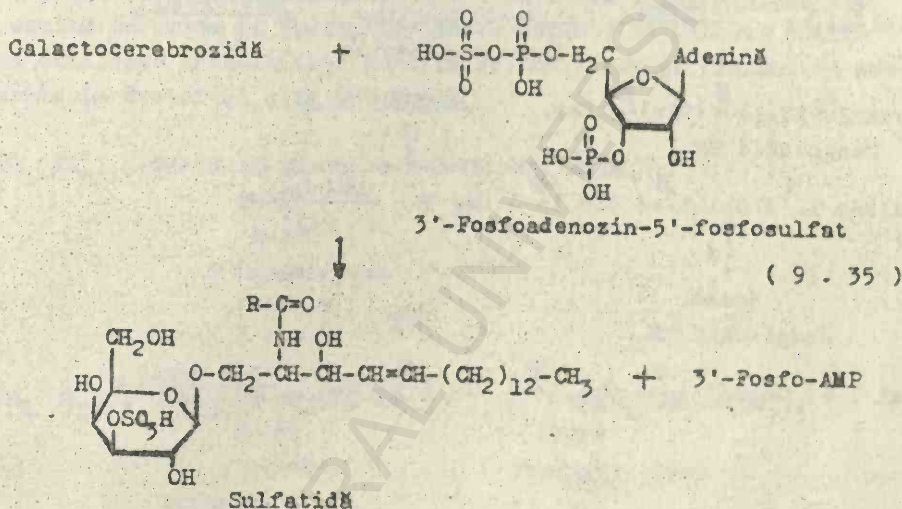


Galactocerebrozidă

Procesul de biosinteză a cerebrozidelor se desfăşoară cu o viteză crescută în perioada de mielinizare a sistemului nervos.

9.6.2. Biosinteza sulfatidelor

Sulfatidele se sintetizează din galactocerebrozidă şi 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfat, reacţia fiind catalizată de galactocerebrozid-sulfokinază (ecuaţia 9.35), enzimă existentă în microsomii creierului. Acidul sulfuric esterifică grupa 3'-OH a galactocerebrozidei.



9.6.3. Biosinteza gangliozidelor

Gangliozidele sînt cele mai complexe glicosfingolipide. Ele se sintetizează pe calea reacţiilor succesive ale ceramidelor (Cer) cu nucleotid-glucidele. Spre deosebire de cerebrozide şi ceramidoligozaharide, gangliozidele conţin în moleculele lor acizi sialici. Denumirea de acizi sialici se atribuie unor glucide acide cum sînt acizii N-acetilneuraminic (NeuAc) şi N-glicolilneuraminic (NeuGly). Drept donori de glucoză (Glc), galactoză (Gal) şi N-acetilgalactozamină (GalNAc) servesc UDP-Glc, UDP-Gal şi UDP-GalNAc. Derivatul CMP cu NeuAc este donorul activat al acestui acid sialic. Gangliozidele, notate cu G, se denumesc după numărul resturilor de acizi sialici: M - monosialo-; D - disialo-. In acest

mod, denumirile gangliozidelor indică tipul combinaţiei, de exemplu, gangliozidul GM_1 reprezintă combinaţia monosialică de tip 1, gangliozidul GD_1 - combinaţia disialică de tip 1 etc. Structura gangliozidelor este determinată de specificitatea glicoziltransferazelor existente în celulă. Se cunosc mai mult de 15 gangliozide diferite. Mai jos se detaliază reacţiile implicate în biosinteza cîtorva gangliozide (fig.9.24).

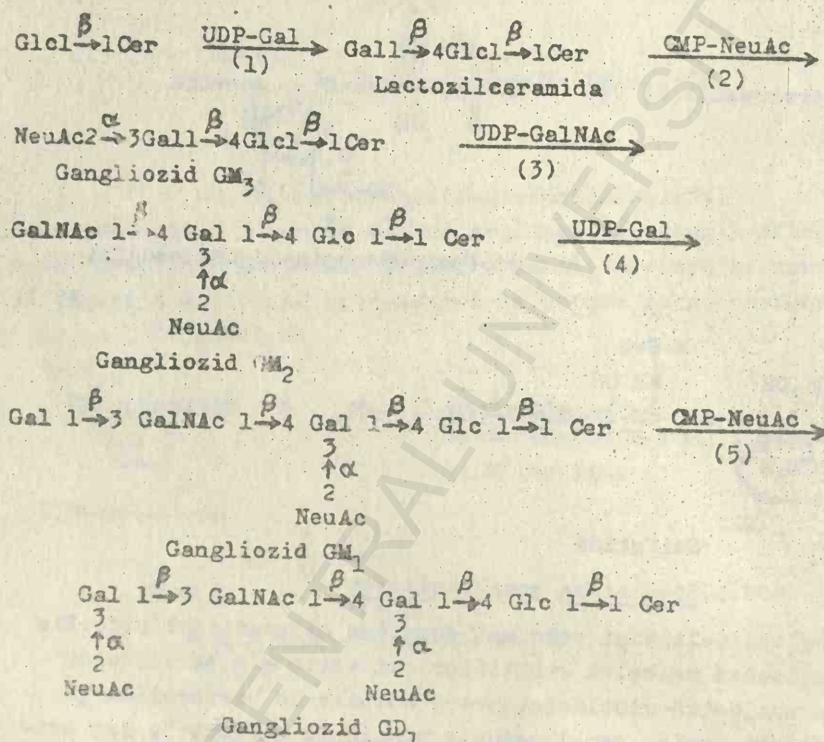


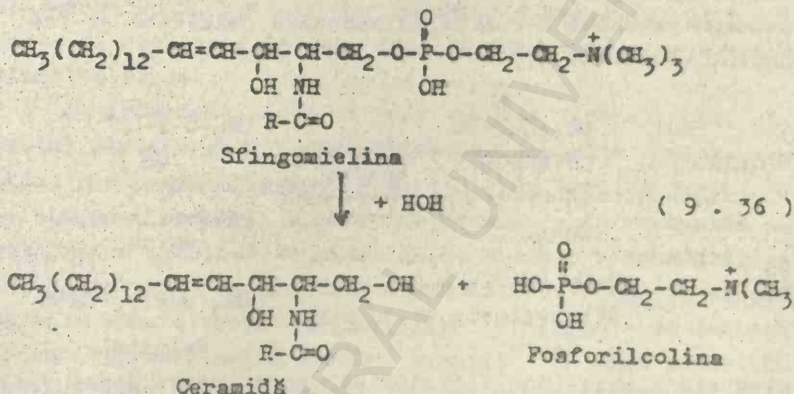
Fig.9.24. Biosinteza unor gangliozide monosialice (GM_3, GM_2, GM_1) şi gangliozidului disialic GD_1. Reacţiile (2) şi (5) necesită Mg^{2+}, iar reacţiile (3) şi (4) - Mn^{2+}.

Etapele notate în fig.9.24 sînt catalizate de următoarele enzime: etapele (1) şi (4) de glicolipidgalactozil-transferaze, etapele (2) şi (5) de glicolipidsialil-transferaze, iar reacţia (3) de glicolipid-N-acetilgalactozamin-transferază.

9.7. CATABOLISMUL SFINGOLIPIDELOR

Sfingomielinele şi glicosfingolipidele se sintetizează şi se descompun permanent în organismul viu. In condiţii normale există un echilibru între anabolismul şi catabolismul sfingolipidelor.

Catabolismul sfingolipidelor este catalizat de hidrolaze specifice, localizate de obicei în lizozomii tuturor celulelor. Prin hidroliza sfingomielinelor sub acţiunea sfingomielinazelor rezultă ceramida şi fosforilcolina (ecuaţia 9.36). Aceste enzime se întîlnesc în cantităţi mari în splină, ficat şi rinichi, de asemenea, în creier şi alte ţesuturi.



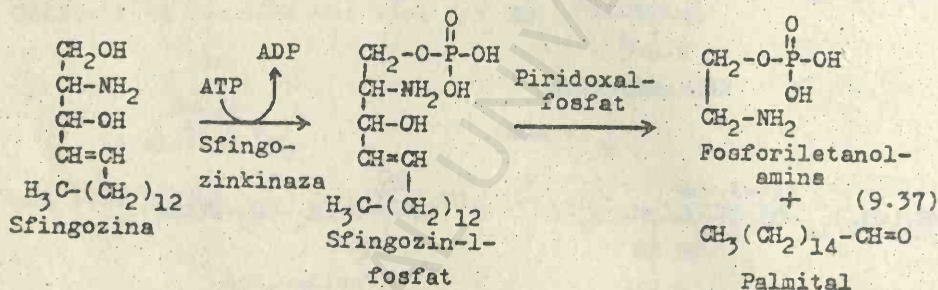
In boala Nieman-Pick sau sfingomielinoză se constată acumularea de sfingomieline în ficat, splină şi creier, datorită unei erori congenitale care determină lipsa sfingomielinazei.

Cerebrozidele sînt hidrolizate în ceramidă şi monoglucidă sau în acid gras şi glicozilsfingozină. Scindarea galactocerebrozidelor în ceramidă şi β-galactoză este catalizată de galactozilceramid-β-galactozilhidrolază care lipseşte în leucodistrofia Krabbe. Hidroliza glucocerebrozidelor decurge în prezenţa glucozilceramid-β-glucozidazei existentă în leucocite. Absenţa acestei enzime în boala Gaucher determină acumularea excesivă a glucozilceramidei în ficat, măduva osoasă, plămîni, creier şi leucocite, conducînd în final la lezarea ficatului şi splinei. Recent s-a constatat că animalele domestice, de asemenea, contractează această maladie.

Sulfatidele sînt hidrolizate în sulfat şi galactozilceramidă de către sulfatază. Lipsa acestei enzime este cauza leucodiatrofiei metacromatice, caracterizată prin acumularea sulfatidelor în ţesuturi.

Catabolismul ga[illegible]ozidelor se realizează cu participarea hexozaminidazelor, neuraminidazei şi glicozidazelor. Deficienţa hexozaminidazei A(β-N-acetilgalactozaminidazei) conduce la boala Tay-Sachs, în care concentraţia gangliozidului GM_2 în creier şi splină depăşeşte de cîteva ori valoarea normală.

Ceramidele rezultate prin hidroliza sfingolipidelor pot fi utilizate în procesele de biosinteză sau pot fi scindate de către ceramidaze în sfingozină şi acid gras. Catabolizarea sfingozinei în celule decurge pe calea formării de aldehidă palmitică şi fosforiletanolamină (ecuaţia 9.37).



In creier eta[illegible]olamina (sau fosfatul ei) poate servi drept precursor pentru sinteza colinei sau poate participa la formarea fosfatidiletanolaminei.

10.METABOLISMUL AMINOACIZILOR

10.1.BIOSINTEZA AMINOACIZILOR(AA)

Biosinteza aminoacizilor pornește de la intermediarii metabolismului glucidelor. Azotul și sulful necesari pentru sinteza aminoacizilor provin din formele anorganice oxidate corespunzătoare N_2, NO_3^- și SO_4^{2-}, care în prealabil suferă un proces de reducere. Din aminoacizii formați se sintetizează toate combinațiile organice conținînd azot.

10.1.1.Reducerea azotului molecular

Atomul de azot din aminoacizi, pirimidine, purine și alte biomolecule este furnizat de NH_3 care se obține din N_2. Organismele superioare nu posedă capacitatea de a converti N_2 în formă organică. Reducerea N_2 pînă la NH_3, denumită fixarea azotului molecular poate fi realizată de numeroase bacterii, unele ciuperci și algele albastre-verzi.

Se deosebesc bacterii care trăiesc libere în sol și pot fixa azotul atmosferic în condiții aerobe(genurile Azotobacter, Beijerinckia) sau anaerobe(genurile Clostridium, Desulfovibrio). Se cunosc, de asemenea, bacterii simbiotice fixatoare de azot care intră în relații de simbioză cu plantele, de exemplu microorganismele genului Rhizobium - cu plantele leguminoase, Klebsiella pneumoniae - cu anumite plante tropicale, Spirillum lipoferum - cu ierburi tropicale, iar reprezentanții genului Frankia - cu unii arbori, ca de exemplu, arinul. Unele bacterii Rhizobium pot fixa N_2 și în culturi pure.

Procesul de fixare a azotului se află sub controlul operonului Nif(nitrogen fixation). Importanța fixării azotului pentru omenire este enormă și numeroase cercetări au ca obiectiv introducerea genelor Nif în plantele superioare care normal nu fixează azotul.

N_2 este o moleculă foarte stabilă și pentru activarea legăturii triple dintre cei 2 atomi de azot se cere o energie foarte mare. De aceea sinteza chimică a NH_3 din N_2 și H_2 are loc la temperaturi și presiuni înalte.

Procesul biologic de fixare a N_2 este catalizat de un sistem enzimatic, numit nitrogenază . Complexul nitrogenazei cuprinde doi

componenți care sînt cunoscuți sub numele de proteina 1(numită înainte molibdoferredoxină) și proteina 2(sau azoferredoxina). Ambii componenți sînt Fe-S-proteine, în care Fe se leagă cu grupele -SH ale resturilor de cisteină și atomii de sulf anorganic. Proteina 2, deosebit de sensibilă față de O_2, este un dimer alcătuit din două peptide identice cu M=30.000 D. Dimerul conține 4 Fe, 4 S și 12 grupe -SH. Proteina 1 este construită din două tipuri de polipeptide cu M=51.000 și 60.000 D, care se asociază într-un tetramer mixt cu structura $\alpha_2\beta_2$. In tetramer intră 2 atomi de Mo, 24 Fe, 24 S și circa 30 grupe -SH titrabile. In complexul activ al nitrogenazei, doi dimeri ai proteine 2 se asociază cu un tetramer al proteinei 1. Un model actual al acestui complex se redă în fig. 10.1.

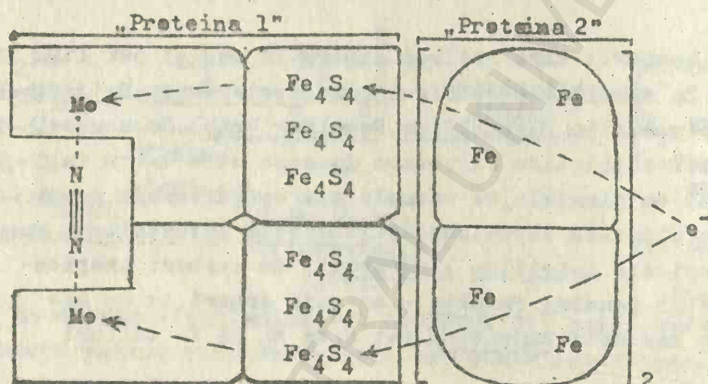
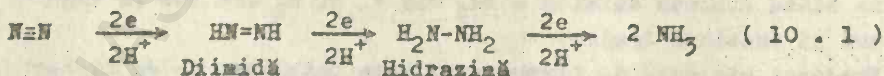


Fig.10.1. Structura ipotetică a nitrogenazei. Proteina 1 este un tetramer de tipul $\alpha_2\beta_2$; proteina 2 - dimer de tipul α_2; Fe_4S_4 - claster fier-sulf; proteinele 1 și 2 se află în raportul 1:2.

Reducerea N_2 la NH_3 necesită 6e care se consumă în trei etape conform ecuației 10.1.



$$N\equiv N \xrightarrow[2H^+]{2e} \underset{\text{Diimidă}}{HN=NH} \xrightarrow[2H^+]{2e} \underset{\text{Hidrazină}}{H_2N-NH_2} \xrightarrow[2H^+]{2e} 2\ NH_3 \qquad (10.1)$$

Transportul electronilor de la NADPH are loc prin intermediul proteinei 2 și proteinei 1, ultima interacționînd direct cu N_2(fig.10.2). Electronii de la NADPH sînt cedați proteinei 2. In

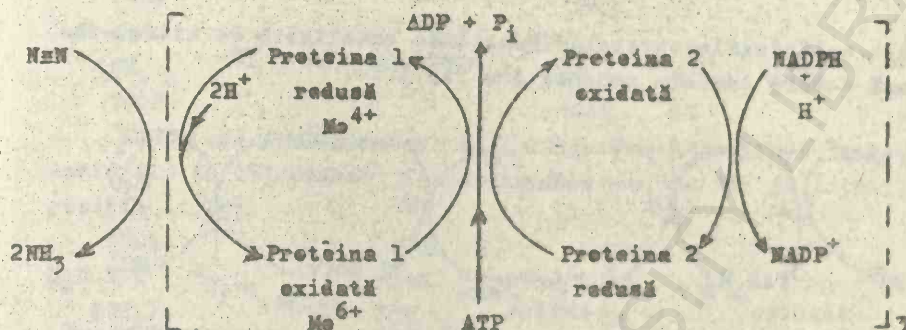


Fig.10.2. Succesiunea reacţiilor în complexul nitrogenazei. Cifra 3 indică că pentru reducerea N_2 la $2NH_3$ se cer trei etape de doi electroni succesive de tipul imaginat (ecuaţia 10.1).

prezenţa unui exces de energie, eliberată prin hidroliza ATP legat puternic cu proteina 2, are loc scăderea potenţialului ei oxido-reducător, ceea ce facilitează transportul electronilor spre proteina 1 care, în final, reduce N_2 la amoniac. Pentru fiecare pereche de electroni transportaţi se cheltuiesc 2-5 ATP. Necesitatea unei cantităţi aşa mari de ATP, probabil, se corelează cu faptul că nitrogenaza, de asemenea, poate să reducă H^+ şi această reacţie este conjugată cu fixarea azotului.

Sistemul nitrogenazei se inactivează foarte repede în prezenţa O_2. De aceea fixarea N_2 trebuie considerată un proces strict anaerob. In rădăcinele plantelor leguminoase se sintetizează <u>leghemoglobina</u> care leagă O_2, ferind nitrogenaza de inactivare.

Reglarea activităţii nitrogenazei se realizează pe două căi. Acumularea unui exces de NH_3 în celula vegetală duce la reprimarea sintezei enzimei. Un control fin asupra activităţii nitrogenazei exercită ADP sau mai exact raportul ATP/ADP. Dacă formarea ATP scade în intensitate şi raportul ATP/ADP ia valori sub 0,5, fixarea N_2 de către nitrogenază se întrerupe.

10.1.2. <u>Reducerea nitratului</u>

Diferite microorganisme şi majoritatea plantelor superioare pot folosi ca sursă de azot nitraţii, pe care-i reduc în NH_3 într-un proces bifazic. In primul stadiu catalizat de <u>nitrat-reductază</u> are loc reducerea nitratului pînă la nitrit. Această enzimă repre-

zintă o molibdenflavoproteină. Reacţiile catalizate de nitrat-reductază decurg conform schemei din fig.10.3.

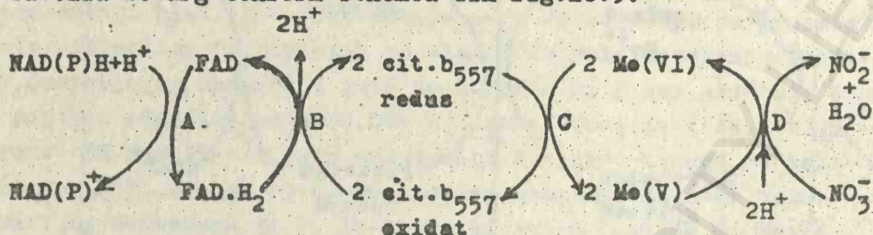
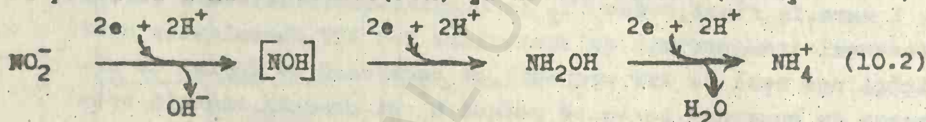


Fig.10.3. Etapele reacţiilor catalizate de nitrat-reductază. Reacţiile A şi B sînt catalizate de NADPH-citocrom b_{557}—reductază. Aceasta se află ataşată la nitrat-reductaza propriu-zisă (care catalizează reacţiile C şi D) prin intermediul unei proteine cu M=10.000-20.000 D, care leagă molibdenul.

In cel de al doilea stadiu, enzima nitrit-reductaza realizează reducerea nitritului în NH_3, cu formarea ca produşi intermediari probabil a nitroxilului (NOH) şi hidroxilaminei (ecuaţia 10.2).



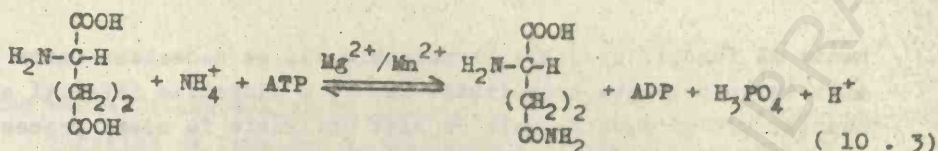
Nitrit-reductaza din spanac şi dovleac are M=61.000-70.000 D şi constă probabil din două subunităţi. In compoziţia ei intră, de asemenea, fieroporfirina numită <u>sirohem</u> care, probabil, participă la transportul celor 6 electroni.

10.1.3. <u>Incorporarea NH_3 în aminoacizi şi proteine</u>

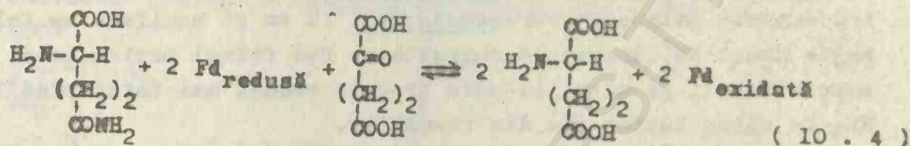
Amoniacul rezultat în urma procesului de fixare a N_2, reducerii nitratului sau în alte procese metabolice este convertit rapid în combinaţii organice azotate.

In procesul de asimilare a NH_3 revine un rol deosebit glutamin-sintetazei, glutamin : 2-oxoglutarat—aminotransferazei (GOGAT) şi glutamat-dehidrogenazei.

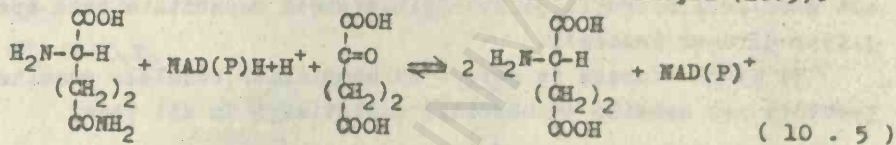
Glutamin-sintetaza catalizează includerea NH_4^+ în grupa amidică a glutaminei, după reacţia (10.3).



GOGAT din frunze, nodozitățile leguminoaselor, rădăcinele și semințele de leguminoase folosește ferredoxina(Fd) și catalizează reacția (10.4).

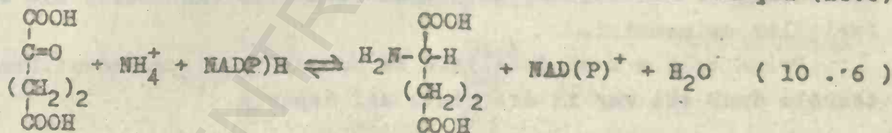


GOGAT NAD(P)H-dependentă, prezentă în bacterii, în frunze, rădăcini și semințele în formare, catalizează reacția (10.5).



In urma reacțiilor (10.3) și (10.4) sau (10.5) are loc formarea unei molecule de acid glutamic dintr-o moleculă de acid 2-cetoglutaric și ionul NH_4^+.

Un rol esențial în asimilarea NH_4^+ la unele organisme vegetale joacă glutamat-dehidrogenaza care catalizează reacția (10.6).



La unele plante, bacterii și drojdii pe o cale analoagă se produce aminarea reductivă, directă a piruvatului și oxalilacetatului, cu formarea alaninei și respectiv aspartatului.

Grupa amidică a glutaminei și grupa amino a glutamatului direct sau indirect constituie practic sursa tuturor atomilor de azot, care intră în compoziția aminoacizilor și a altor combinații biochimice azotate.

Biosinteza aminoacizilor este absolut necesară pentru toate organismele vii, întrucît ei reprezintă unitățile structurale ale proteinelor și precursorii multor biomolecule care îndeplinesc o

serie de funcţii speciale.Organismele vii se deosebesc între ele atît în ce priveşte capacitatea lor de a sintetiza diferiţi aminoacizi cît şi după formele de azot utilizate în acest proces.

Omul şi animalele pot sintetiza numai 10 din cei 20 de aminoacizi necesari pentru formarea proteinelor.Ceilalţi,aşa-numiţii aminoacizi esenţiali sau neinlocuibili sînt primiţi cu hrana.Pentru sinteza aminoacizilor neesenţiali la om şi mamifere se foloseşte numai NH_4^+.Animalele rumegătoare pot folosi pentru acest scop nitriţii şi nitraţii care trebuie reduşi mai întîi pînă la NH_3 de către bacteriile din rumegător.

Spre deosebire de animale,plantele superioare posedă capacitatea de a sintetiza toţi aminoacizii folosind ca sursă de azot amoniacul,nitraţii şi nitriţii.Această capacitate este specifică şi unor bacterii.

Pe lîngă sinteza de novo a aminoacizilor,celulele anumitor ţesuturi pot asimila aminoacizii sintetizaţi în alt ţesut.

10.1.4.Căile principale de biosinteză a aminoacizilor

In general se poate vorbi despre trei căi principale de biosinteză a aminoacizilor: 1)aminarea directă a α-cetoacizilor sau a acizilor organici nesaturaţi;2)reacţiile de transaminare între aminoacizi şi α-cetoacizi şi 3)transformările enzimatice ale diferiţilor aminoacizi.

Prima cale a fost detaliată în subcapitolul precedent.Următoarele două căi vor fi discutate mai departe.

10.1.4.1.Biosinteza aminoacizilor neesenţiali

Sinteza acidului glutamic a fost discutată mai sus.Prin transaminarea acidului glutamic cu acidul piruvic sau acidul oxalilacetic rezultă alanina,respectiv acidul aspartic.La plante şi microorganisme ultimii doi aminoacizi se pot sintetiza de asemenea pe calea aminării reductive a α-cetoacizilor menţionaţi.

Reducerea ATP-dependentă a grupei γ-carboxilice din acidul glutamic sub acţiunea NADPH conduce la γ-semialdehida corespunzătoare,care se ciclizează şi se reduce,transformîndu-se în prolină.

Ornitina poate lua naştere din arginină.La rîndul său,orni-

tina poate fi convertită în prolină.

Tirozina se formează în organismul animal pe calea hidroxilării fenilalaninei. La organismele autotrofe biosinteza fenilalaninei şi tirozinei se realizează din acid fosfoenolpiruvic şi eritrozo-4- fosfat pe calea acidului shikimic(fig.10.4).

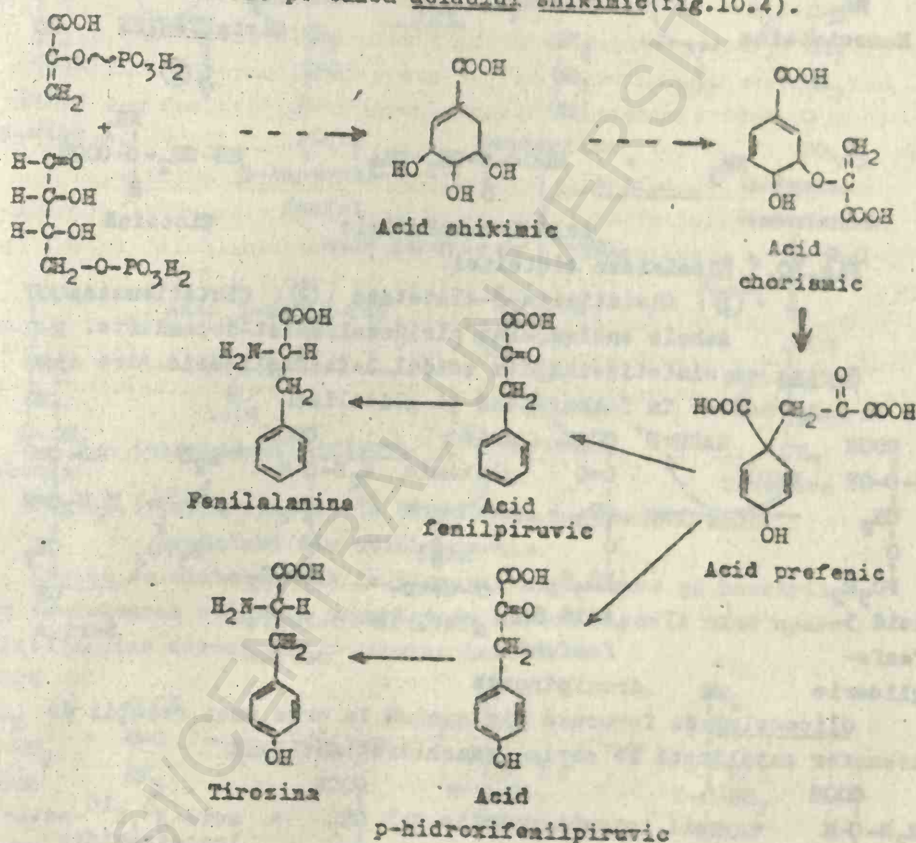


Fig.10.4. Biosinteza fenilalaninei şi tirozinei pe calea acidului shikimic.

Cisteina se sintetizează în organismele animale din metionină şi serină(fig.10.5).

In plante şi microorganisme cisteina se formează din serină şi H_2S.

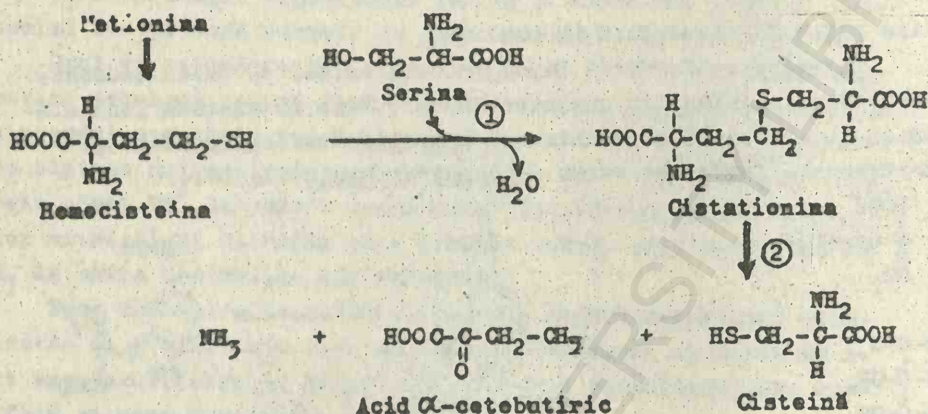
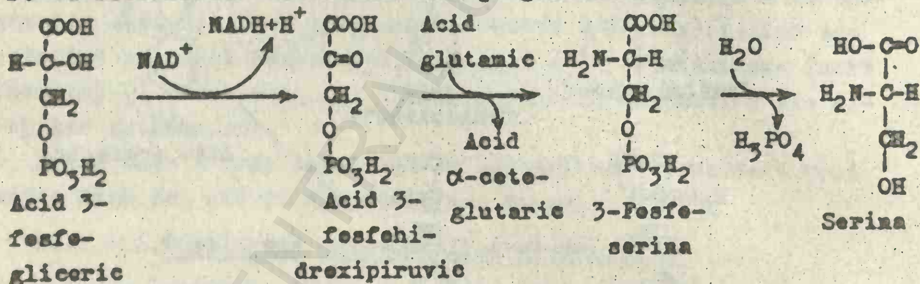
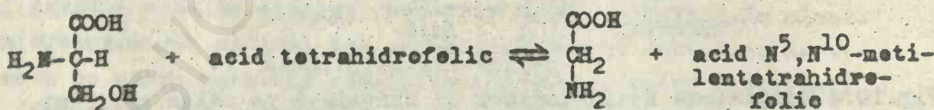


Fig.10.5.Biosinteza cisteinei.
①: Cistationin-β-sintetaza ; ②: Cistationaza.
Ambele enzime sînt piridoxalfosfat-dependente.

Serina se sintetizează din acidul 3-fosfogliceric care apare ca intermediar în fotosinteză şi glicoliză:



Glicocolul se formează din serină în urma unei reacţii de transfer catalizată de serin-transhidroximetilază:



Glicocolul se poate forma de asemenea din CO_2, NH_4^+ şi acid metilentetrahidrofolic în reacţia catalizată de glicin-sintază.

10.1.4.2.Biosinteza aminoacizilor esenţiali

Aminoacizii esenţiali se sintetizează pe rute mai complexe, în comparaţie cu căile de biosinteză ale aminoacizilor neesenţiali.

<u>Metionina</u> şi <u>treonina</u> au ca precursor acidul aspartic care în primele etape comune ale procesului biosintetic se transformă în homoserină. Mai departe reacţiile se diferenţiază (fig.10.6).

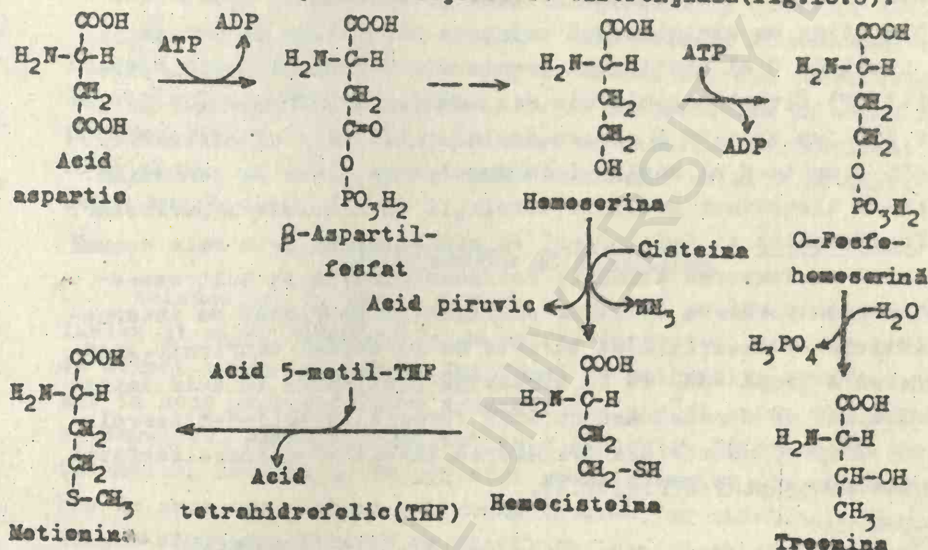
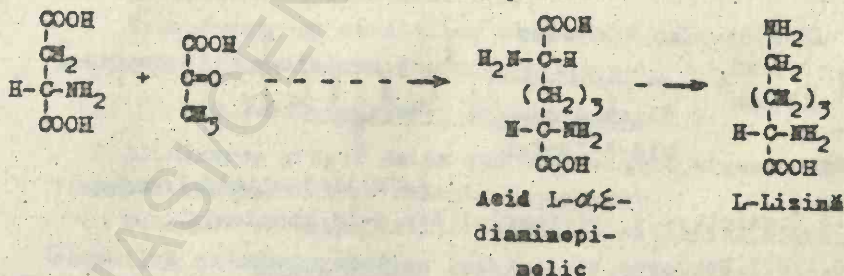


Fig.10.6. Unele reacţii în biosinteza metioninei şi treoninei din acid aspartic.

<u>Lizina</u> se sintetizează în plantele superioare şi bacterii prin condensarea acidului aspartic cu acidul piruvic cînd apare ca intermediar acidul L-α,ε-diaminopimelic:



La ciuperci, biosinteza lizinei pleacă de la acidul α-cetoglutaric şi acetil-CoA cu formarea acidului α-aminoadipic ca intermediar.

<u>Valina</u>, <u>leucina</u> şi <u>izoleucina</u> sînt aminoacizi cu catenă alifatică ramificată. Sinteza lor pleacă de la acidul piruvic, care în urma unor secvenţe de mai multe reacţii este convertit în

α-cetoacizii analogi acestor aminoacizi.In ultima etapă are loc transaminarea α-cetoacizilor la aminoacizii indicaţi.

Arginina se poate sintetiza la animale din ornitină,însă în cantităţi foarte mici.La plante şi microorganisme arginina se formează plecînd de la carbamilfosfat şi glutamat.

Histidina se sintetizează printr-o succesiune de 9 reacţii. Cei 5 atomi de C ai histidinei provin din 5-fosforibozil-1-pirofosfat(PRPP).Ciclul pirimidinic din adenina ATP furnizează un atom de N şi un atom de C pentru inelul imidazolic al histidinei. Celălalt atom de N al ciclului imidazolic este dat de glutamină. Biosinteza histidinei prezintă corelaţii cu biosinteza purinelor.

Fenilalanina şi triptofanul se sintetizează pe o cale comună cuprinzînd condensarea acidului fosfoenolpiruvic şi eritrozo-4-fosfatului cu formarea acizilor shikimic şi chorismic ca intermediari(fig.10.4).Reacţiile se bifurcă de la acidul chorismic.Acesta,primind o grupă $-NH_2$ de la glutamină(Gln),trece în acid antranilic.Ultimul se condensează cu PRPP formînd indolil-3-glicerolfosfatul.Triptofansintetaza transformă indolil-3-glicerolfosfatul şi serina în triptofan(fig.10.7).

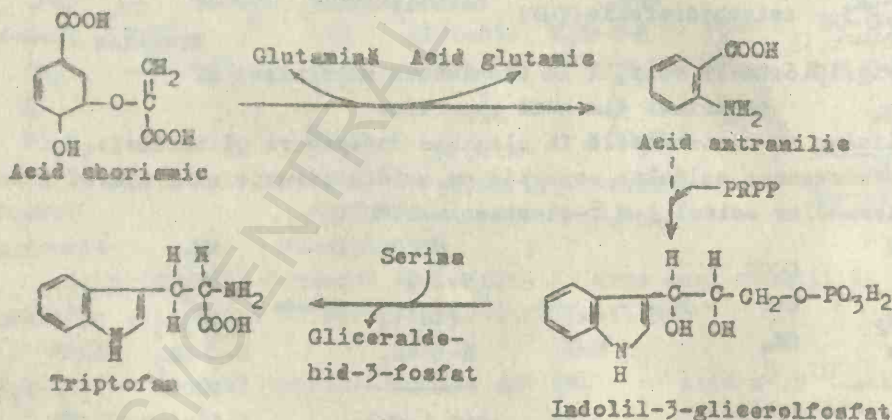


Fig.10.7.Biosinteza triptofanului din acid chorismic.

10.1.4.3.Reglarea biosintezei aminoacizilor

- Biosinteza aminoacizilor este reglată după principiul feed-back.Aminoacidul sintetizat acţionează ca inhibitor asupra uneia din primele reacţii cu care începe secvenţa în care el se formează.

După alt mecanism se reglează sinteza enzimelor care catalizează formarea aminoacizilor.

Primul mecanism asigură o „reglare fină", întrucît este capabil să modifice repede viteza de biosinteză a oricăruî aminoacid în dependență de concentrația lui staționară la momentul dat.

Al doilea mecanism de reglare este folosit atunci cînd celula este aprovizionată din belșug cu aminoacizi din surse exogene. In condiții normale aminoacizii nu se sintetizează în exces. In procesul de evoluție s-a consolidat un mecanism perfecționat datorită căruia în celula vie fiecare aminoacid se află în cantitate echilibrată.

10.2. CATABOLISMUL AMINOACIZILOR

Aminoacizii în exces față de necesarul pentru sinteza proteinelor și altor biomolecule nu pot fi depozitați, spre deosebire de acizii grași și glucoză. Surplusul de aminoacizi este catabolizat în scop energetic. După îndepărtarea grupei amino din aminoacizi, scheletul carbonic rezultat este convertit într-o serie de intermediari metabolici. Majoritatea grupelor amino ale aminoacizilor în exces se elimină sub formă de uree, iar scheletele lor carbonice sînt transformate în acetil-CoA, acetilacetil-CoA, acid piruvic sau metaboliți ai ciclului Krebs. Prin urmare, aminoacizii pot fi convertiți în acizi grași, corpi cetonici sau glucide.

In organismele animale și vegetale catabolismul aminoacizilor se desfășoară pe căi comune pentru toți acești compuși și pe căi specifice fiecăruia dintre ei.

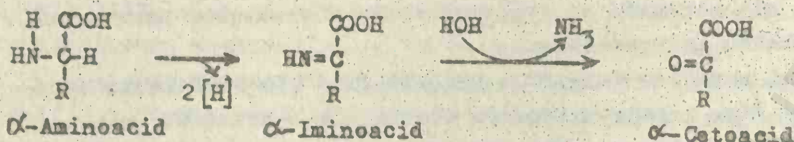
Transformările catabolice comune ale aminoacizilor sînt dezaminarea, transaminarea și decarboxilarea.

10.2.1. Dezaminarea aminoacizilor

Eliminarea grupei amino din substanțele organice azotate cu formarea amoniacului se numește dezaminare.

Dezaminarea aminoacizilor poate fi oxidativă, hidrolitică, reductivă și desaturantă.

Dezaminarea oxidativă a aminoacizilor conduce la un cetoacid și NH_3. Acest proces se desfășoară în două etape, după următorul mecanism :



Dezaminarea oxidativă a aminoacizilor este catalizată de oxidazele L- şi D-aminoacizilor care sînt localizate în peroxizomi. Ele sînt enzime flavinice şi conţin ca grupare prostetică FMN sau FAD. Gruparea prostetică a aminoacid-oxidazelor poate transfera H luat de la substrat direct O_2, cu formarea H_2O_2.

Dezaminarea oxidativă a aminoacizilor poate fi realizată şi de oxidoreductaze avînd coenzime NAD^+ şi $NADP^+$. Dintre aceste enzime cea mai importantă este glutamatdehidrogenaza (GDH) care catalizează reacţia (10.6). NAD(P)H format în această reacţie, se poate oxida prin lanţul respirator. GDH este prezentă în ficatul, inima şi rinichii animalelor, de asemenea, în plante, drojdii şi unele bacterii.

In dezaminarea hidrolitică a aminoacizilor se formează NH_3 şi hidroxiacidul corespunzător :

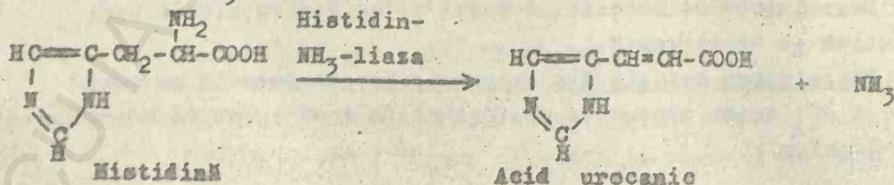


Dezaminarea reductivă are loc cu adiţionarea hidrogenului după următoarea reacţie :



Acest tip de dezaminare este specific microorganismelor şi unor plante.

Dezaminarea desaturantă sau intramoleculară, catalizată de enzime din clasa liazelor (EC 4.3.1), este caracteristică pentru unii aminoacizi, de exemplu, histidină. Produşii dezaminării desaturante sînt NH_3 şi un acid carboxilic nesaturat :



Dezaminarea cisteinei,metioninei,serinei,treoninei,acidului aspartic și aminoacizilor heterociclici se desfășoară pe căi specifice,avînd ca produși finali,de asemenea,cetoacizii și acizii carboxilici nesaturați.

Cetoacizii,hidroxiacizii,acizii carboxilici saturați și nesaturați rezultați prin dezaminarea aminoacizilor pot fi catabolizați mai departe pînă la CO_2 și apă sau pot participa în sinteza altor substanțe.

10.2.2.Transaminarea aminoacizilor

Transferul grupării amino de la un aminoacid la un cetoacid, fără formarea NH_3 ca produs intermediar,se numește transaminare. Ca rezultat al acestui proces se formează un nou cetoacid și un nou aminoacid :



Reacția de transaminare a fost descoperită de biochimiștii sovietici A.E.Braunștein și Maria G.Kritzman(1937).

In celula vie transaminarea este catalizată de transaminaze(aminotransferaze) care au în calitate de grupare prostatică piridoxal-5'-fosfatul(PALP).In timpul transaminării PALP trece reversibil în piridoxamin-5'-fosfat(PAMP) :

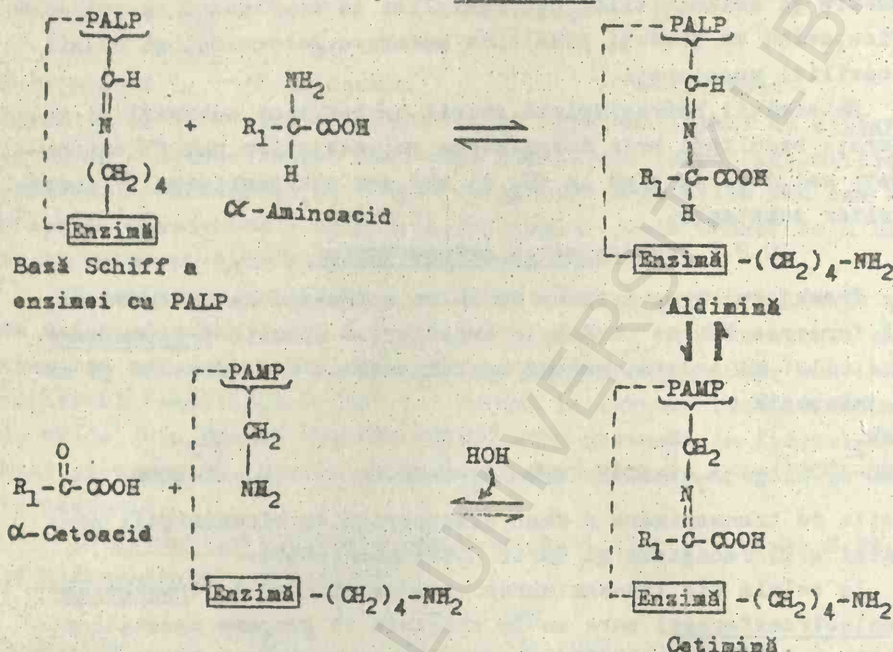


Piridoxal-5'-fosfat Piridoxamin-5'-fosfat

In lipsa substratului,grupa aldehidică a PALP se leagă printr-o legătură aldiminică cu grupa ε-NH_2 a unui rest specific de lizină din centrul activ al enzimei,formînd o bază Schiff.

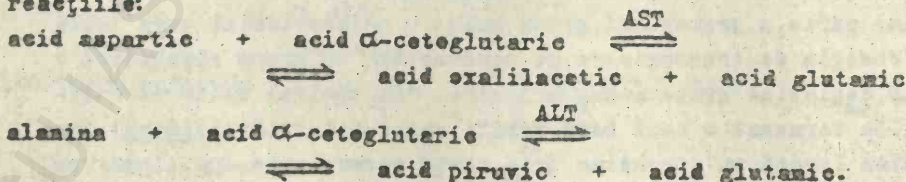
Mecanismul reacției de transaminare cuprinde două părți.In prima parte a procesului,grupa amino a aminoacidului care intră în reacția de transaminare,se condensează cu grupa aldehidică a PALP,deplasînd grupa ε-NH_2 a lizinei din centrul activ al enzimei.Se formează o nouă bază Schiff aminoacid-PALP(aldimina) care rămîne legată cu apoenzima prin forțe necovalente.Apoi,legătura dublă în aldimină își schimbă poziția formînd o cetimină care

este hidrolizată la PAMP şi un α-cetoacid :



In cealaltă parte a transaminării, enzima-PAMP reacţionează cu α-cetoacidul (acceptor al grupei amino) şi toate reacţiile se repetă în sens invers, adică se formează întîi <u>cetimina</u>, apoi <u>aldimina</u>. Ultima se hidrolizează dînd naştere unui nou <u>α-aminoacid</u> şi regenerînd enzima-PALP (succesiunea de reacţii este dată pe pagina 237).

Aminotransferazele sînt larg răspîndite în ţesuturile animale, plante şi microorganisme. In prezent se cunosc peste 50 de aminotransferaze diferite. Cele mai bine studiate sînt <u>aspartat-aminotransferaza</u> (AST) şi <u>alanin-aminotransferaza</u> (ALT) care catalizează reacţiile:



acid aspartic + acid α-cetoglutaric $\xrightleftharpoons{AST}$

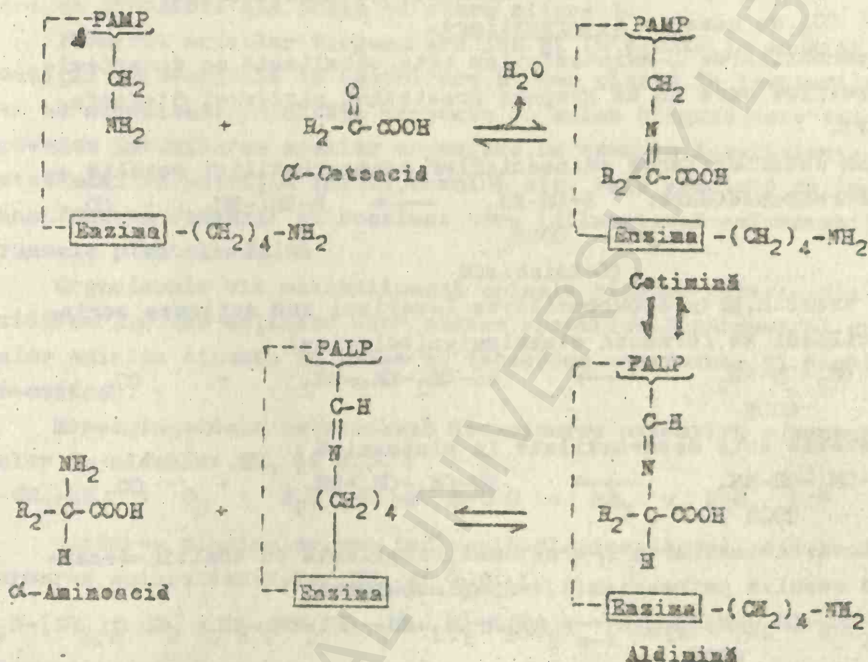
$\rightleftharpoons$ acid oxalilacetic + acid glutamic

alanina + acid α-cetoglutaric $\xrightleftharpoons{ALT}$

$\rightleftharpoons$ acid piruvic + acid glutamic.

Determinarea activităţii AST şi ALT în serul sanguin se

practică în laboratorul clinic pentru diagnosticarea unor maladii ale ficatului și inimii.



In general, aminotransferazele sînt enzime înalt specifice în raport cu cele două substrate, avînd o mai mare afinitate pentru cetoacid decît pentru aminoacid.

In metabolismul substanțelor, transaminarea joacă un rol deosebit. Ca reacția de transaminare se corelează biosinteza și degradarea aminoacizilor. Dezaminarea L-aminoacizilor nu se face, în general, direct, ci pe calea transaminării între acești aminoacizi și acidul α-cetoglutaric. La rîndul său acidul glutamic format este dezaminat oxidativ sub acțiunea GDH. Fiind reversibilă, reacția de transaminare servește pentru sinteza L-aminoacizilor din cetoacizi și acid glutamic.

Reacția de transaminare participă la biosinteza unor substanțe specifice (uree, acid γ-aminobutiric etc.).

In fine, reacția de transaminare prin intermediul substratelor sau produșilor săi face legătura între metabolismul proteinelor și metabolismele glucidelor și lipidelor.

10.2.3. Decarboxilarea aminoacizilor

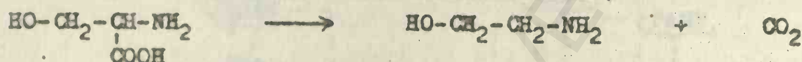
Pierderea grupei carboxil din molecula aminoacizilor sub formă de CO_2 se numeşte decarboxilare.

Decarboxilarea L-aminoacizilor este catalizată de decarboxilaze specifice care au ca grupare prostetică piridoxal-5'-fosfatul(PALP).

Prin decarboxilarea aminoacizilor monocarboxilici rezultă aminele corespunzătoare:

$$\underset{\alpha\text{-Aminoacid}}{R-\underset{COOH}{\underset{|}{C}H}-NH_2} \longrightarrow \underset{\text{Amină}}{R-CH_2-NH_2} + CO_2$$

De exemplu, prin decarboxilarea L-serinei sub acţiunea serindecarboxilazei se formează etanolamina(colamina) :



$$HO-CH_2-\underset{COOH}{\underset{|}{C}H}-NH_2 \longrightarrow HO-CH_2-CH_2-NH_2 + CO_2$$

Cisteina este decarboxilată în cisteamină :



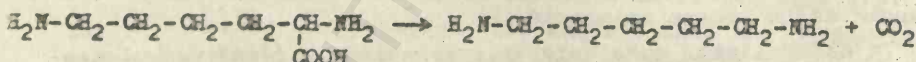
$$HS-CH_2-\underset{COOH}{\underset{|}{C}H}-NH_2 \longrightarrow HS-CH_2-CH_2-NH_2 + CO_2$$

Prin decarboxilarea L-ornitinei, catalizată de ornitin-decarboxilază rezultă putrescina(1,4-diaminobutanul) :



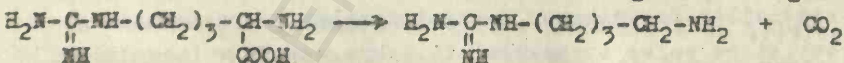
$$H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-\underset{COOH}{\underset{|}{C}H}-NH_2 \longrightarrow H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2 + CO_2$$

Lizina este decarboxilată de lizin-decarboxilază în cadaverină(1,5-diaminopentan) :



$$H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-\underset{COOH}{\underset{|}{C}H}-NH_2 \longrightarrow H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2 + CO_2$$

Arginin-decarboxilaza decarboxilează arginina în agmatină :



$$H_2N-\underset{NH}{\underset{\|}{C}}-NH-(CH_2)_3-\underset{COOH}{\underset{|}{C}H}-NH_2 \longrightarrow H_2N-\underset{NH}{\underset{\|}{C}}-NH-(CH_2)_3-CH_2-NH_2 + CO_2$$

Intrucît diferite amine, care apar prin decarboxilarea aminoacizilor manifestă în organismul viu o puternică acţiune fiziologică, ele au primit numele de amine biogene(M.Guggenheim,1951).

Unele amine biogene joacă rolul de precursori în biosinteza hormonilor, iar la plante şi în biosinteza alcaloizilor. Alte amine biogene posedă acţiune toxică şi de aceea excesul lor în organismele vegetale şi animale este dăunător.

O cantitate mare de amine biogene se formează îndeosebi la

descompunerea alimentelor bogate în proteine,sub acţiunea microorganismelor.Astfel se explică intoxicările cauzate de carne,mezeluri şi preparate din peşte în stare alterată.

Formarea aminelor biogene are loc şi în plante.In anumite condiţii nefavorabile de dezvoltare a unor plante,în ţesuturile lor se acumulează cantităţi crescute de amine biogene,care pot să provoace intoxicarea acestor organisme.De exemplu,insuficienţa potasiului în nutriţia inului,orzului etc. este asociată cu intensificarea formării putrescinei care influenţează nefavorabil frunzele plantelor.

Organismele vii metabolizează aminele biogene toxice prin oxidarea lor sub acţiunea unor enzime specifice.După numărul grupelor aminice atacate în amine se deosebesc monoamino- şi diamino-oxidaze.

Monoaminoxidaza catalizează dezaminarea oxidativă a monoaminelor în aldehide,NH_3 şi H_2O_2 :

$$R-CH_2-NH_2 + O_2 + H_2O \longrightarrow R-\overset{H}{\overset{|}{C}}=O + NH_3 + H_2O_2$$

Oxidarea diaminelor,sub influenţa diaminoxidazei,conduce la formarea aminoaldehidelor,NH_3 şi H_2O_2 :

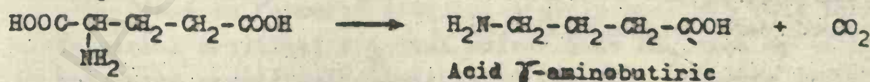


$$H_2N-(CH_2)_n-NH_2 + O_2 + H_2O \longrightarrow H_2N-(CH_2)_{n-1}-CH=O + NH_3 + H_2O_2$$

Aldehidele rezultate se pot oxida mai departe în acizii corespunzători.H_2O_2 este descompusă de catalază sau peroxidază.

Aminoxidazele îndeplinesc o importantă funcţie de detoxifiere în organismele vii,unde sînt la fel de răspîndite ca şi decarboxilazele aminoacizilor.

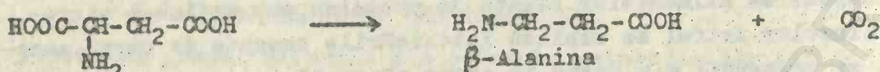
Decarboxilarea aminoacizilor poate să conducă şi la alţi produşi decît aminele.Astfel prin decarboxilarea acizilor monoaminodicarboxilici se formează acizii monoaminomonocarboxilici corespunzători.In urma decarboxilării acidului glutamic,catalizată de glutamat-decarboxilază,rezultă acidul γ-aminobutiric(mediator al inhibiţiei în sistemul nervos central) :



$$HOOC-\underset{NH_2}{\underset{|}{CH}}-CH_2-CH_2-COOH \longrightarrow H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-COOH + CO_2$$

Acid γ-aminobutiric

Aspartat-decarboxilaza transformă acidul aspartic în β-alanină(component al coenzimei A) :



$$HOOC-\underset{\displaystyle NH_2}{CH}-CH_2-COOH \longrightarrow \underset{\beta\text{-Alanina}}{H_2N-CH_2-CH_2-COOH} + CO_2$$

10.2.4.Produşii finali ai metabolismului aminoacizilor

Metabolizarea aminoacizilor conduce în final la apă,CO_2 şi NH_3.Apa participă la procesele metabolice,CO_2 se elimină din organism fără nici o greutate şi NH_3 este convertit în compuşi azotaţi netoxici.

10.2.4.1.Metabolismul amoniacului

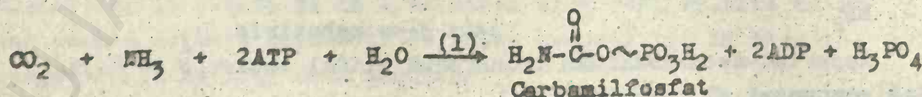
NH_3 liber,chiar în concentraţie mică,este deosebit de toxic pentru animale şi plante.Organismele vii posedă diferite mecanisme de neutralizare şi îndepărtare a NH_3 apărut în reacţiile biochimice.

Nevertebratele acvatice inferioare elimină NH_3 direct în mediul înconjurător.Nevertebratele terestre,păsările şi reptilele transformă NH_3 în acid uric.Omul,mamiferele,peştii maritimi cartilaginoşi şi amfibienii convertesc NH_3 în uree şi parţial în alantoină şi acid uric.Aceste trei grupuri de organisme se numesc amoniotelice,uricotelice şi ureotelice.

In plante NH_3 se fixează şi se acumulează sub forma amidelor acizilor glutamic şi aspartic,sărurilor de amoniu ale acizilor organici,de asemenea,sub formă de uree,citrulină,arginină, alantoină şi acid alantoic.

10.2.4.1.1.Formarea ureei.Sinteza ureei în organismul omului şi animalelor ureotelice se realizează predominant în ficat,printr-o succesiune complexă de reacţii biochimice,numită ciclul ureogenetic sau ciclul ornitinei care a fost propus de H.Krebs şi K.Hanseleit în 1932.

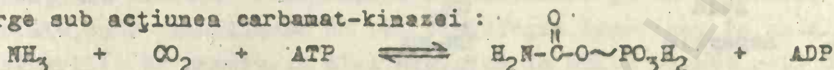
Prima reacţie a ciclului ureogenetic este formarea carbamilfosfatului.La animalele ureotelice carbamilfosfatul se sintetizează din NH_3,CO_2,ATP şi H_2O într-o reacţie complexă,catalizată de carbamilfosfat-sintază(reacţia 1) :



$$CO_2 + NH_3 + 2ATP + H_2O \xrightarrow{(1)} \underset{\text{Carbamilfosfat}}{H_2N-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-O\sim PO_3H_2} + 2ADP + H_3PO_4$$

O particularitate deosebită a acestei enzime constă în aceea că

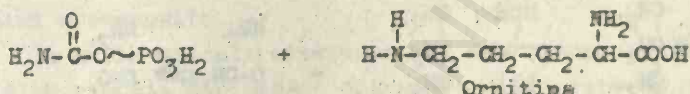
ea necesită drept cofactori acidul N-acetilglutamic şi Mg^{2+}. Consumarea a 2 ATP face această sinteză a carbamilfosfatului practic ireversibilă. La microorganisme sinteza carbamilfosfatului decurge sub acţiunea carbamat-kinazei :



$$NH_3 + CO_2 + ATP \rightleftharpoons H_2N-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-O\sim PO_3H_2 + ADP$$

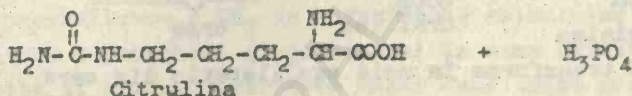
După date mai noi carbamat-kinaza acţionează în direcţie opusă, asigurînd sinteza ATP la bacteriile care descompun arginina. In ciuperci şi plantele superioare prima etapă a ciclului ureogenetic, de asemenea, este realizată de carbamilfosfat-sintază, dar în prezenţa HCO_3^- şi L-glutaminei, a cărei grupă amidică furnizează N pentru sinteza carbamilfosfatului.

In a doua etapă a ciclului ureogenetic restul carbamil este transferat de la carbamilfosfat la ornitină, rezultînd citrulina (reacţia 2).



$$H_2N-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-O\sim PO_3H_2 + \underset{\text{Ornitina}}{H-\overset{\overset{H}{|}}{N}-CH_2-CH_2-CH_2-\overset{\overset{NH_2}{|}}{CH}-COOH}$$

$$\downarrow (2)$$

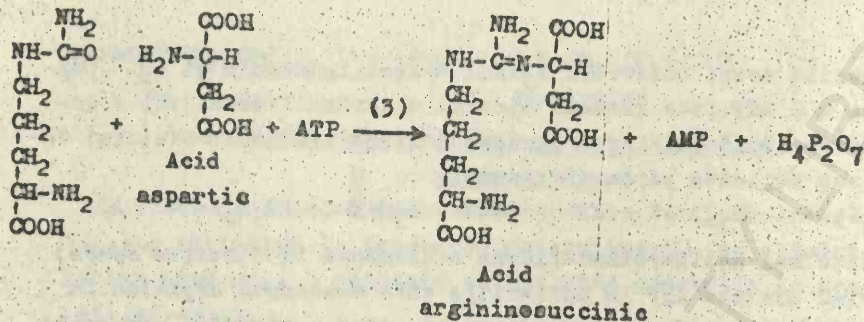


$$\underset{\text{Citrulina}}{H_2N-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-NH-CH_2-CH_2-CH_2-\overset{\overset{NH_2}{|}}{CH}-COOH} + H_3PO_4$$

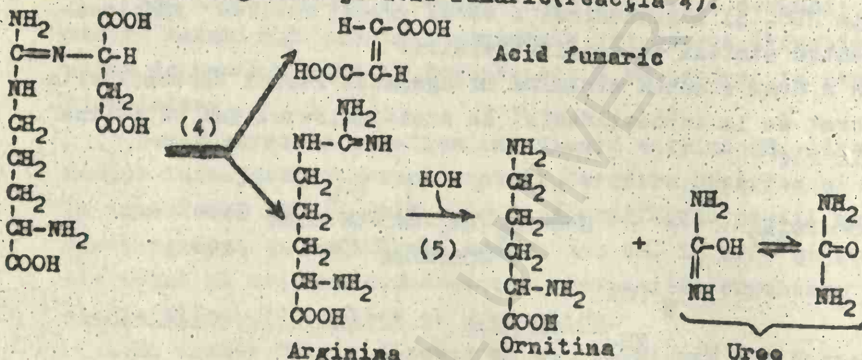
Reacţia (2) este catalizată de ornitin-carbamil—transferază care a fost descoperită în ficatul şi intestinul animalelor ureotelice, în plante, drojdii şi unele microorganisme. Enzima lipseşte din organismul păsărilor.

In etapa următoare, citrulina se condensează cu acidul aspartic, reacţia avînd loc cu un consum însemnat de energie care se obţine prin clivajul ATP în AMP şi pirofosfat. Această reacţie, catalizată de argininsuccinat-sintetază, în prezenţa Mg^{2+}, conduce la acidul argininosuccinic (reacţia 3).

Odată cu formarea acidului argininosuccinic este introdusă în ciclul ornitinei o a doua moleculă de NH_3, însă nu ca atare, ci sub forma grupei amino aparţinînd acidului aspartic. Azotul aminic din molecula acidului aspartic provine tot din NH_3 rezultat prin dezaminarea amineacizilor. Acidul aspartic se formează pe calea aminării sau transaminării acidului oxalilacetic.



Mai departe argininosuccinat-liaza scindează acidul argininosuccinic în arginină şi acid fumaric(reacţia 4).



Acidul fumaric se poate transforma în acid oxalilacetic din care se regenerează acidul aspartic necesar în ciclul ureogenetic.

Ultima etapă a ciclului ureogenetic cuprinde hidroliza argininei în ornitină şi uree,sub acţiunea arginazei(reacţia 5).Această enzimă se găseşte în cantitate mare în ficat şi în proporţii mai reduse în creier şi rinichi.Ea este activată de Mg^{2+}, Ca^{2+} şi alţi cationi bivalenţi.

Reacţia de descompunere a argininei în uree şi ornitină închide ciclul ureogenetic.Ornitina,care joacă rolul de transportor al atomilor de C şi N din molecula ureei,poate să reacţioneze cu o nouă moleculă de carbamilfosfat şi toate reacţiile indicate mai sus se repetă.Deci formarea ureei este un proces ciclic.Primele două reacţii ale ciclului ureogenetic se desfăşoară în mitocondrie,iar următoarele trei reacţii conducînd la uree,au loc în citosol.

La animalele ureotelice ureea sintetizată în ficat este transportată de sînge la rinichi şi eliminată cu urina. La omul matur se elimină circa 20 g de uree în 24 de ore.

Reacţiile ciclului ureogenetic se întîlnesc şi la organismele vegetale, unde îndeplinesc un rol fiziologic important în asimilarea sărurilor de amoniu. In plus, arginina la multe plante este o rezervă de azot organic. Prin scindarea argininei în ornitină se asigură formarea activă a prolinei şi acidului glutamic, iar hidroliza ureei în CO_2 şi NH_3 de către urează facilitează utilizarea repetată a NH_3 pentru aminarea reductivă a α-cetoacizilor şi pentru amidificarea aminoacizilor dicarboxilici.

Dacă cei doi atomi de N ai ureei rezultă din metabolismul aminoacizilor, atomul de carbon este oferit de CO_2 eliberat prin oxidarea metaboliţilor în ciclul acizilor tricarboxilici cuplat cu lanţul respirator, care, de asemenea, furnizează ATP necesar ciclului ureogenetic.

In unele maladii ereditare are loc blocarea parţială a diferitelor reacţii din ciclul ureogenetic, asociată cu hiperamonemie.

10.2.4.1.2. Biosinteza asparaginei şi glutaminei. O altă cale de neutralizare a NH_3 în organismele animalelor şi plantelor este sinteza asparaginei şi glutaminei în urma amidării acizilor aspartic şi glutamic. Formarea celor două amide are loc sub acţiunea asparagin-sintetazei (AsnS) şi respectiv glutamin-sintetazei (GlnS) conform reacţiilor :

$$\underset{\text{Acid L-aspartic}}{H_2N-CH(CH_2-C(=O)OH)-COOH} + NH_4^+ + ATP \xrightarrow{Mg^{2+}} \underset{\text{L-Asparagină}}{H_2N-CH(CH_2-C(=O)NH_2)-COOH} + ADP + H_3PO_4$$

$$\text{Acid L-glutamic} + NH_4^+ + ATP \underset{}{\overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons}} \text{L-Glutamina} + ADP + H_3PO_4 \quad (10.3)$$

Asparagina şi glutamina, alături cu aminoacizii formaţi prin aminarea directă a acizilor α-cetocarboxilici, constituie o formă importantă de transport şi depozitare a NH_3 în organismul animal, iar la plante reprezintă o formă de asimilare şi acumulare a NH_3 din sol în sistemul radicular. Aceste amide servesc ca surse de grupe aminice şi amidice în diverse biosinteze. Hidroliza aspara-

ginei şi glutaminei se realizează sub influenţa asparaginazei şi respectiv glutaminazei.

10.2.4.2.Metabolismul radicalului hidrocarbonat al aminoacizilor

Strategia degradării aminoacizilor prevede formarea de intermediari metabolici majori care pot fi convertiţi în alte substanţe sau pot fi oxidaţi la CO_2 şi H_2O cu eliberarea de energie. Scheletele hidrocarbonate ale diferiţilor aminoacizi sînt catabolizate numai în 7 metaboliţi: piruvat,acetil-CoA,acetilacetil-CoA, α-cetoglutarat,succinil-CoA,fumarat şi oxalilacetat.Acesta este un alt exemplu al remarcabilei economii specifice transformărilor metabolice.

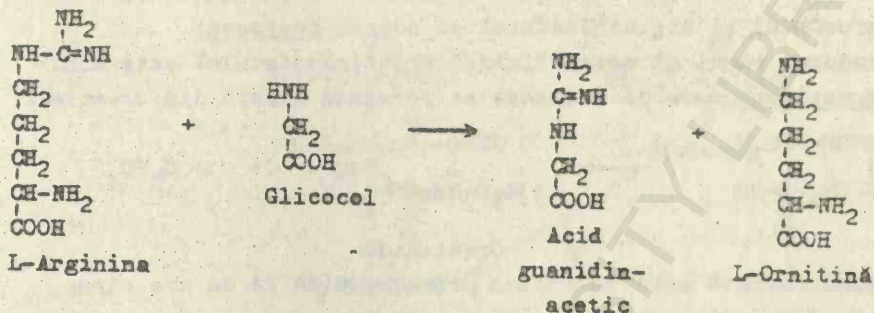
Aminoacizii care sînt degradaţi la acetil-CoA şi acetilacetil-CoA se numesc cetogenici,întrucît ei dau naştere la corpi cetonici.Aminoacizii care sînt catabolizaţi în piruvat,α-cetoglutarat, succinil-CoA,fumarat şi oxalilacetat poartă numele de aminoacizi glucogenici,deoarece din aceşti compuşi se sintetizează glucoza. Din cei 20 de aminoacizi numai leucina este tipic cetogenică.Izoleucina,lizina,fenilalanina,tirozina şi triptofanul sînt atît cetogenici cît şi glucogenici.Ca aminoacizi glucogenici tipici avem alanina,acidul aspartic şi acidul glutamic.

10.2.5.Catabolismul specific al unor aminoacizi

Pe lîngă transformările biochimice generale,comune pentru toţi aminoacizii,ei participă,de asemenea,la procese metabolice specifice,condiţionate de structura chimică şi rolul lor biologic.

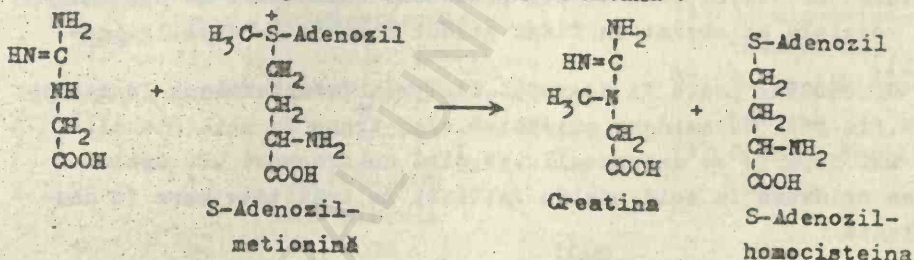
Catabolismul glicocolului(glicinei) se corelează cu biosinteza glucidelor,porfirinelor,bazelor purinice,glutationului,serinei,creatinei şi detoxifierea organismului animal.

In organismul uman şi animal creatina se sintetizează din glicocol,arginină şi metionină,printr-un proces bifazic.Prima etapă cuprinde transamidinarea(transguanidarea) grupei amidinice (guanidinice) de pe arginină pe glicocol.In urma acestui tranfer catalizat de glicin-amidino—transferază rezultă acidul guanidinacetic(glicociamina) :

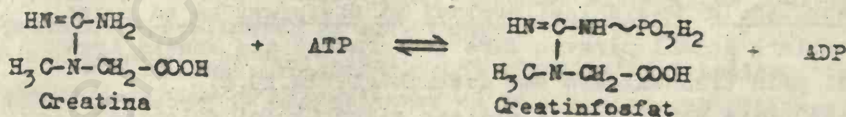


Formarea gliceciaminei decurge activ în rinichi.

In etapa a doua are loc transferul grupei meil de la S-adenozilmetionină(metionina activă) la acidul guanidinacetic,sub acţiunea guanidinacetat-metiltransferazei.Ca produs de reacţie se obţine acidul metilguanidinacetic sau creatina :



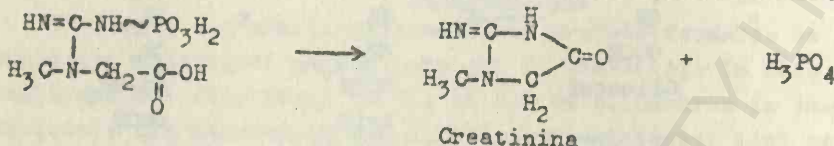
Această etapă se desfăşoară în ficat şi rinichi.Creatina sintetizată în aceste organe este transportată de sînge în alte ţesuturi: creier,muşchi scheletici,miocard etc.In celulele animale creatina participă la transferul grupelor fosfat macroergice pe calea fosforilării ei cu ajutorul ATP în reacţia reversibilă,catalizată de creatin-kinază :



Creatinfosfatul,care se formează şi se acumulează în muşchiul în repaus,constituie un „tampon" de grupe fosfat cu potenţial energetic ridicat pentru contracţia musculară.Acţiunea reversibilă a creatin-kinazei asigură transferul restului fosfat de la creatinfosfat la ADP imediat ce ultimul se formează în urma scindării ATP în contracţia musculară.Unele nevertebrate utilizează arginin-

fosfatul pentru a stoca radicalii de fosfat cu potenţial ridicat. Creatinfosfatul şi argininfosfatul se numesc fosfageni.

Produsul final al metabolizării creatinfosfatului este anhidrida creatinina, care de asemenea se formează direct din creatină:

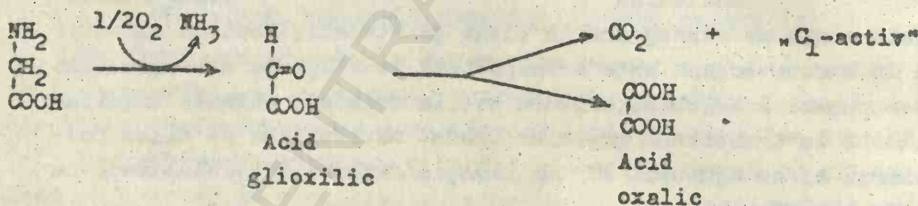


Creatinina

Creatinina formată este excretată prin urină(în 24 de ore circa 1,5 g).In distrofia musculară progresivă la om se elimină creatina în cantitate mare, datorită incapacităţii muşchiului de a o fixa.

Glicocolul deţine un rol important în detoxifierea organismului uman de unele substanţe nocive. Astfel, prin condensarea glicocolului cu acidul benzoic din produsele alimentare de provenienţă vegetală se obţine în ficat acidul hipuric(N-benzoilglicocolul).

Glicocolul poate fi degradat, fie prin decarboxilare la metilamină, fie prin dezaminare oxidativă, cînd trece în acid gloxilic, care mai departe se decarboxilează, dînd un fragment „C_1-activ" sau se oxidează în acid oxalic întîlnit în cantitate mare în unele plante :



Catabolismele α-alaninei, serinei şi cisteinei au ca punct de intersectare acidul piruvic care se formează din aceşti trei aminoacizi prin transaminare sau dezaminare(fig.10.8).

Serina poate participa la sinteza glicocolului, colaminei, fosfatidilserinei şi fosfoproteinelor.

O cale importantă de catabolizare a cisteinei la animale este oxidarea ei în acid cisteinsulfinic, care poate fi oxidat mai departe în acid cisteic. Prin decarboxilarea ultimului compus rezultă taurina(ecuaţia 10.7).

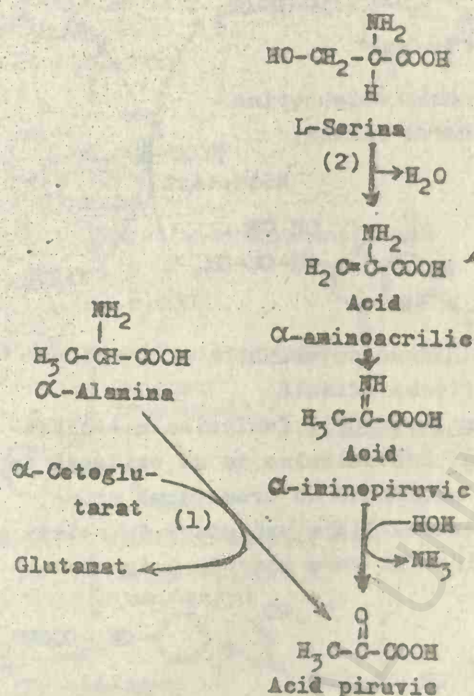
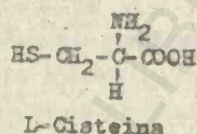
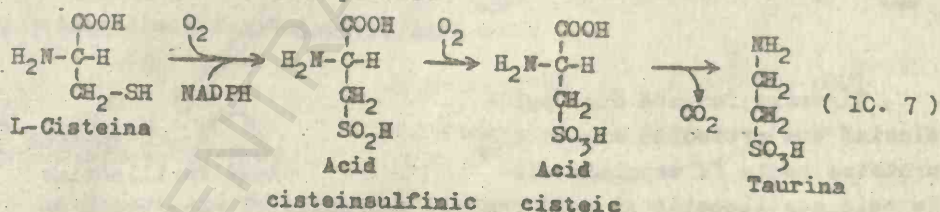



Fig.10.8. Conversia alfa-alaninei, serinei și cisteinei în acid piruvic. (1): Alanin-aminotransferaza; (2): Serin-dehidrataza și (3): Cistein-desulfhidraza

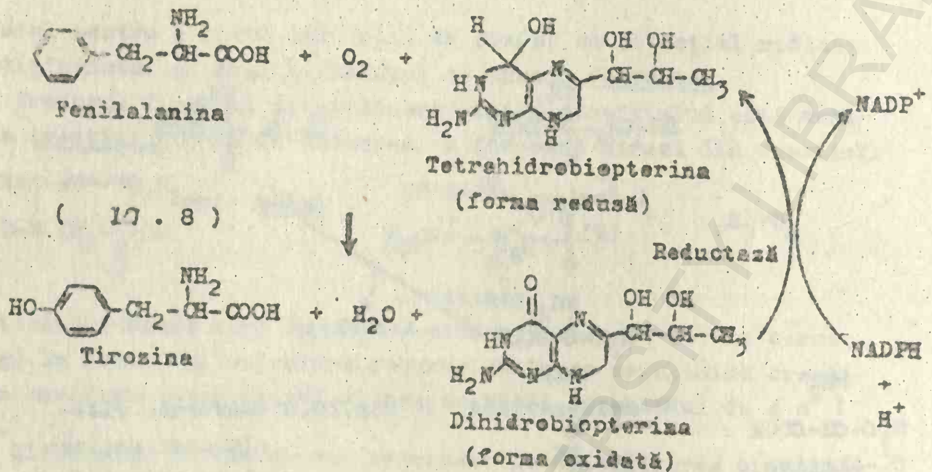


(10. 7)

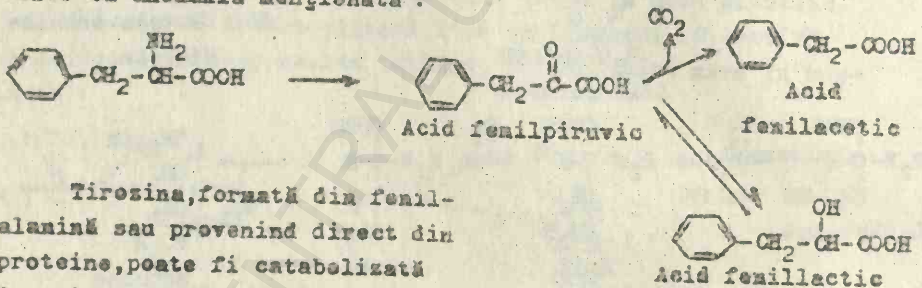
Taurina participă la biosinteza acizilor biliari conjugați și probabil îndeplinește și alte roluri.

<u>Catabolismul</u> <u>fenilalaninei</u> <u>și</u> <u>tirozinei.</u> Catabolismul fenilalaninei începe cu hidroxilarea ei în tirozină sub acțiunea <u>fenilalanin-4-hidroxilazei</u>, enzimă numită și <u>monooxigenază</u> sau <u>oxigenază</u> <u>cu</u> <u>funcție</u> <u>mixtă</u>, întrucît un atom din O_2 apare în produsul de reacție și altul în H_2O(ecuația 10.8).

Reacția catalizată de fenilalanin-4-hidroxilază este ireversibilă, ceea ce explică de ce tirozina nu poate înlocui fenilalanina în alimentație. In anomalia metabolică congenitală, numită



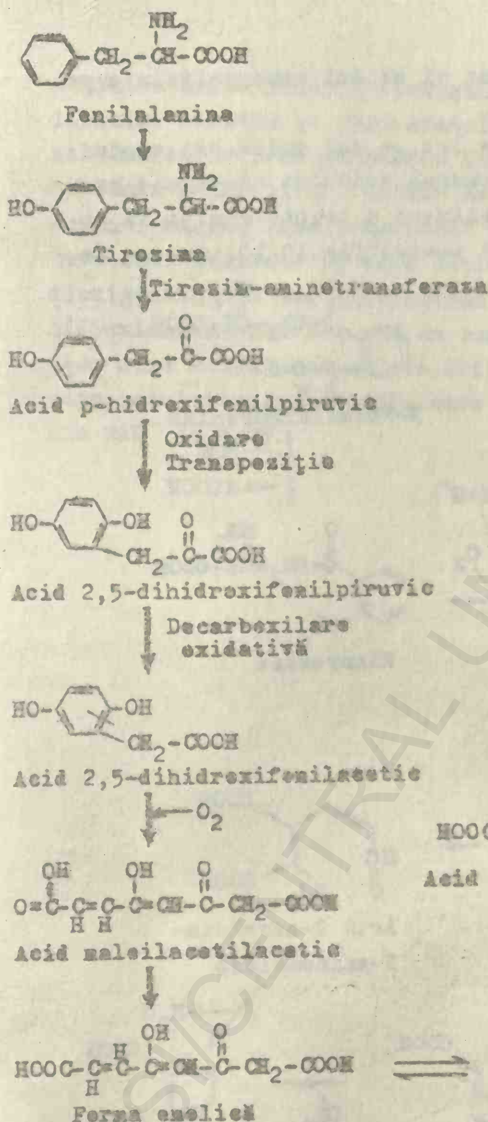
oligofrenie fenilpiruvică sau fenilcetonurie, fenilalanin-4-hidroxilaza are o activitate scăzută şi fenilalanina nu se oxidează în tirozină. Excesul de fenilalanină neoxidată se transformă prin transaminare sau dezaminare şi decarboxilare oxidativă în acizii fenilpiruvic, fenillactic şi fenilacetic care apar în urina bolnavilor cu anomalia menţionată :



Tirozina, formată din fenilalanină sau provenind direct din proteine, poate fi catabolizată în acid acetilacetic şi acid fumaric sau poate fi convertită în unii hormoni şi pigmenţi melanici.

Catabolizarea tirozinei începe cu o reacţie de transaminare care conduce la acidul p-hidroxifenilpiruvic(fig.10.9). Acest α-cetoacid se oxidează sub acţiunea unei dioxigenaze în acid 2,5-dihidroxifenilpiruvic care se decarboxilează oxidativ dînd acidul 2,5-dihidroxifenilacetic sau acidul homogentizinic.

In mod normal, acidul homogentizinic este oxidat sub acţiunea homogentizinat-oxidazei, rezultînd acidul 4-maleilacetilacetic.

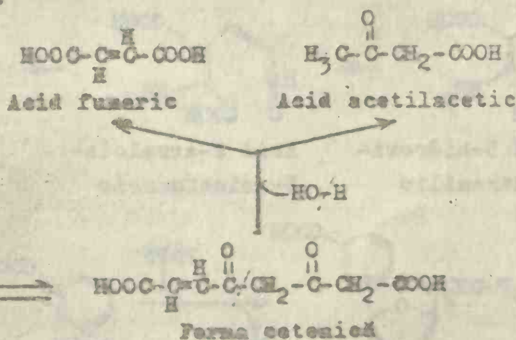


Ultimul derivat este apoi izomerizat în acid 4-fumarilacetilacetic care în final se hidrolizează cu formarea acidului acetilacetic şi acidului fumaric.

Scindarea fenilalaninei şi tirozinei în acizii acetilacetic şi fumaric dovedeşte că aceşti doi aminoacizi sînt cetogeni şi respectiv glucoformatori.

In anomalia metabolică congenitală, cunoscută sub numele de alcaptonu-

Fig.10.9. Degradarea fenilalaninei şi tirozinei în acid acetilacetic şi acid fumaric.



urie,lipsește homogentizinat-oxidaza și acidul homogentizinic se acumulează fiind excretat în urină.

Catabolismul triptofanului are loc pe mai multe căi conducînd la diferiți produși finali. Formarea acidului nicotinic reprezintă calea principală de catabolizare a triptofanului în organismele animale și vegetale. Acest proces(fig.10.10) începe cu

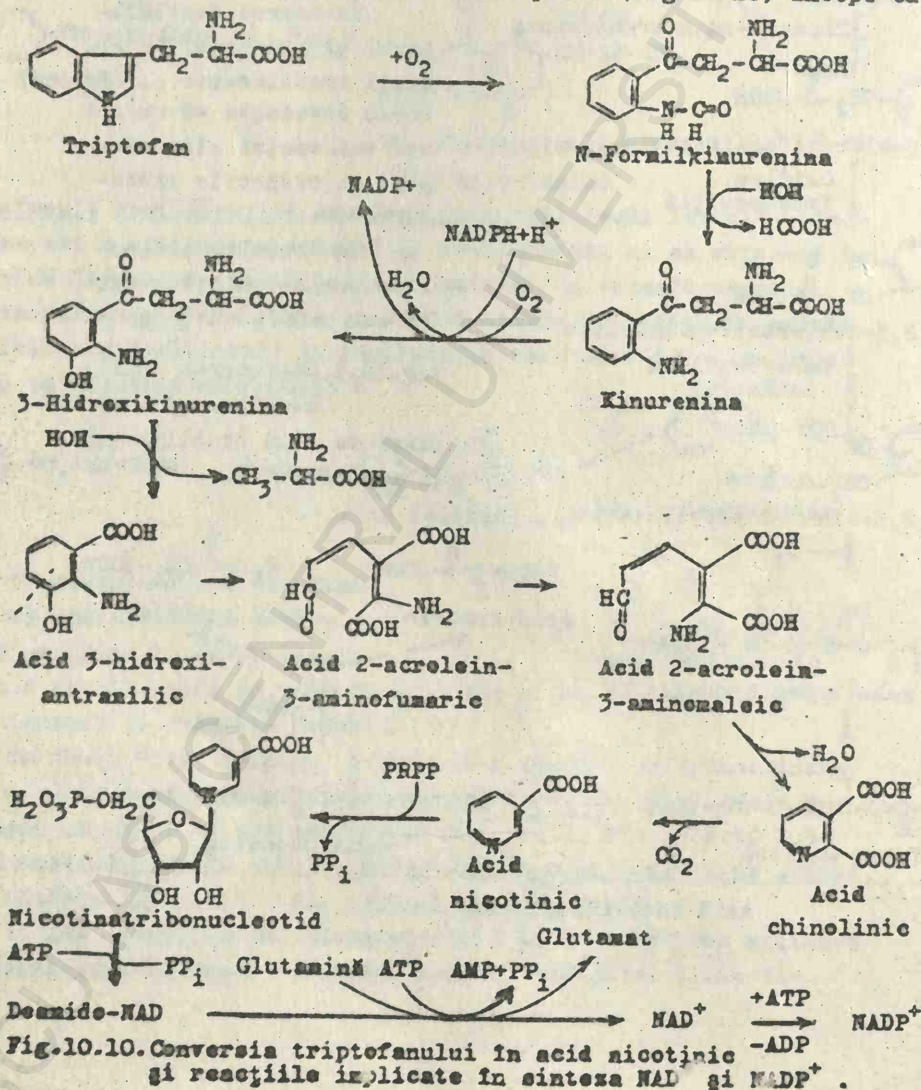


Fig.10.10. Conversia triptofanului în acid nicotinic și reacțiile implicate în sinteza NAD$^+$ și NADP$^+$.

acţiunea triptofan-2,3-dioxigenazei(triptofanpirolazei) asupra inelului pirolic al triptofanului pe care îl transformă în N-formilkinurenină.Prin scindarea hidrolitică a acidului formic din molecula N-formilkinureninei se obţine kinurenina.Enzima L-kinurenin-3-hidroxilaza transformă kinurenina în 3-hidroxikinurenină care este scindată în acid 3-hidroxiantranilic.Sub acţiunea unei dioxigenaze are loc deschiderea inelului benzenic al acidului 3-hidroxiantranilic.Rezultă un compus nesaturat care se ciclizează uşor dînd acidul chinolinic.Ultimul este decarboxilat la acid nicotinic(vitamina PP) din care se sintetizează în organismul viu NAD^+ şi $NADP^+$.

11. METABOLISMUL PROTEINELOR SIMPLE

Metabolismul proteinelor ocupă un loc central între multiplele procese biochimice care se află la baza vieţii. De aceea anabolismul şi catabolismul proteinelor au o importanţă excepţională pentru activitatea şi funcţionalitatea organismelor vii, condiţionînd într-un grad determinat însuşi fenomenul vieţii.

11.1. CATABOLISMUL PROTEINELOR

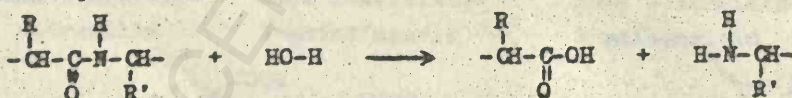
Omul şi animalele sînt dependente de un aport permanent de proteine de provenienţă animală şi vegetală. Organismul animal utilizează nu proteinele primite cu hrana, ci produşii lor de scindare. Hidroliza proteinelor are loc, de asemenea, în plante şi microorganisme.

11.1.1. Hidroliza enzimatică a proteinelor

Hidroliza proteinelor (proteoliza) în organismul viu este un proces enzimatic ce poate conduce la peptide sau aminoacizi.

Scindarea hidrolitică a legăturilor peptidice în proteine şi peptide este catalizată de enzimele specifice numite enzime proteolitice, proteaze sau peptid-hidrolaze. Ele se subîmpart în proteinaze sau peptid-peptidohidrolaze, aminopeptidaze, carboxipeptidaze şi dipeptidaze.

Reacţia generală catalizată de peptid-hidrolaze poate fi exprimată prin schema:



In urma acţiunii peptid-hidrolazelor asupra proteinelor se formează iniţial diferite peptide, apoi un amestec de aminoacizi liberi. Aceştia sînt produşii finali ai hidrolizei enzimatice a proteinelor.

Peptid-hidrolazele se întîlnesc în toate organismele vii. Aceste enzime îndeplinesc o serie de funcţii specifice de o deosebită importanţă.

Astfel, peptid-hidrolazele din tractul gastro-intestinal au rol în digestia proteinelor din hrană.

La nivelul stomacului sînt secretate pepsina, renina etc.

Pepsina se întîlneşte în stomacul tuturor vertebratelor, unde se sintetizează sub forma zimogenului numit pepsinogen. Această proteină lipsită de activitate enzimatică trece în pepsină, sub acţiunea ionilor de hidrogen. Pepsina formată catalizează mai departe activarea pepsinogenului, deci procesul este autocatalitic. Transformarea pepsinogenului (M=42.600 D) în pepsină (M=34.500 D) este însoţită de scurtarea lanţului polipeptidic de la capătul N-terminal, dovedită de diferenţa între masele lor moleculare. Pe baza aceasta se consideră că activarea pepsinogenului aparţine tipului de reacţii de proteoliză limitată.

Intrucît pH sucului gastric este 1 - 2, pepsina posedă o stabilitate deosebit de mare în mediu acid. Ea manifestă acţiune catalitică maximă la pH de 1,8 şi se inactivează la pH mai mare de 5.

Pepsina are o largă specificitate şi hidrolizează în proteine mai ales legăturile peptidice la care participă grupa aminică a aminoacizilor aromatici (fenilalanină şi tirozină), formînd peptide mai mici şi o cantitate mică de aminoacizi liberi.

Renina (ferment de cheag, chimozină) există în stomacul animalelor rumegătoare tinere şi, probabil, al copiilor sugari. Este secretată sub formă de prorenină care la pH 5 trece în forma activă. Are pH optim în jur de 3,5. Necesită Ca^{2+} şi are ca substrat cazeina din lapte pe care o precipită sub formă de cazeinat de calciu.

Proteinele şi peptidele de diferite mărimi din stomac ajung în intestinul subţire unde suferă acţiunea tripsinei, chimotripsinei şi carboxipeptidazei care sînt sintetizate în pancreas.

Tripsina este secretată de pancreasul exocrin sub forma zimogenului numit tripsinogen. Activarea tripsinogenului este iniţiată de enzima enterokinaza (enteropeptidaza) din sucul intestinal, iar mai departe procesul se desfăşoară datorită tripsinei, pe calea ruperii legăturii peptidice între Lys 6 şi Ile 7 cu eliberarea unei hexapeptide de la capătul N-terminal. Activarea tripsinogenului necesită ionii de calciu.

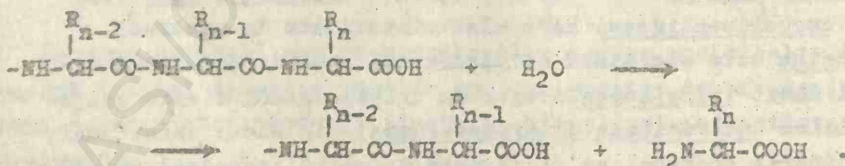
Tripsina are pH optim de activitate cuprins între 7 şi 9.Ea hidrolizează cu viteză maximă legăturile peptidice,amidice şi esterice,la formarea cărora participă grupa -COOH a argininei şi lizinei.

Chimotripsina este sintetizată de celulele pancreasului exocrin sub formă inactivă de chimotripsinogen.Conversia chimotripsinogenului în chimotripsină este realizată de tripsină şi chimotripsina rezultată deja.

Chimotripsina hidrolizează cu viteza cea mai mare,la pH=8-9, legăturile date de grupele carboxilice ale aminoacizilor ciclici (fenilalanină,tirozină,triptofan),de asemenea,legăturile peptidice la care participă leucina şi metionina.Hidroliza substratelor sub acţiunea chimotripsinei implică formarea enzimei acilate ca produs intermediar de reacţie.

Deoarece pepsina,tripsina şi chimotripsina acţionează asupra legăturilor peptidice din interiorul catenelor polipeptidice ale moleculelor de substrat,ele se numesc endopeptidaze(proteinaze). Peptid-hidrolazele care scindează resturile de aminoacizi de la extremităţile catenei polipeptidice sau oligopeptidice se numesc exopeptidaze.Aparţin exopeptidazelor carboxipeptidazele,aminopeptidazele,dipeptidazele.

Carboxipeptidazele sînt sintetizate de pancreas sub formă inactivă de procarboxipeptidaze.In intestinul subţire tripsina activează aceste zimogene,transformîndu-le în carboxipeptidazele A şi B care sînt metaloenzime conţinînd cîte un atom de zinc ca grupare prostetică.Ele scindează resturile de aminoacizi C-terminali în moleculele proteinelor şi peptidelor:



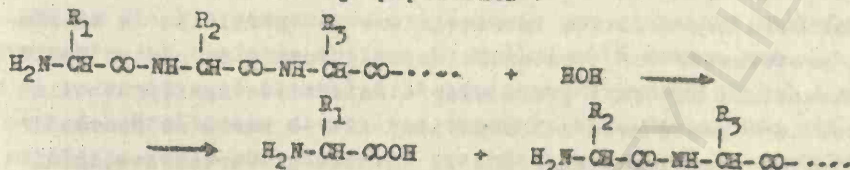
$$-NH-\underset{|}{\overset{R_{n-2}}{}}CH-CO-NH-\overset{R_{n-1}}{CH}-CO-NH-\overset{R_n}{CH}-COOH + H_2O \longrightarrow$$

$$\longrightarrow -NH-\overset{R_{n-2}}{CH}-CO-NH-\overset{R_{n-1}}{CH}-COOH + H_2N-\overset{R_n}{CH}-COOH .$$

Carboxipeptidaza A eliberează cu viteza cea mai mare aminoacizii cu catene laterale aromatice sau alifatice mai lungi,iar carboxipeptidaza B catalizează preferenţial hidroliza resturilor de lizină şi arginină.

Mucoasa intestinului subţire secretă o serie de aminopepti-

daze care hidrolizează resturile de aminoacizi N-terminali din moleculele proteinelor şi peptidelor :



Aminopeptidazele se deosebesc după specificitatea de substrat şi alte proprietăţi.Deosebit de bine studiată este leucilaminopeptidaza din intestinul subţire care atacă substratele conţinînd leucina în poziţia N-terminală.Enzima nativă conţine Zn în molecula sa.Indepărtarea Zn sau înlocuirea lui cu Cd duce la pierderea activităţii leucilaminopeptidazei.Are pH optim între 8 şi 9.

Aminotripeptidaza se găseşte în intestin,plămîni,rinichi, muşchi,sînge etc.Ea acţionează selectiv asupra tripeptidelor alcătuite din L-aminoacizi neutri,scindînd aminoacidul N-terminal.

Dipeptidazele sau dipeptid-hidrolazele catalizează hidroliza diferitelor dipeptide în aminoacizi liberi,desăvîrşind astfel hidroliza proteinelor.Aceste enzime sînt prezente în intestin şi alte ţesuturi.Dipeptidazele manifestă specificitate în funcţie de aminoacizii constituenţi ai substratelor.

In intestinul subţire se întîlneşte şi enteropeptidaza(enterokinaza) care catalizează activarea tripsinogenului în tripsină.

Aminoacizii rezultaţi prin hidroliza proteinelor sînt absorbiţi la nivelul peretelui intestinal şi transportaţi de sînge spre diferite organe şi ţesuturi ale organismului animal,în special spre ficat,apoi muşchi etc.

Enzimele proteolitice din ţesuturile animale.In afară de enzimele proteolitice ale aparatului digestiv există şi peptidhidrolaze localizate intracelular în diferite ţesuturi animale. Aceste enzime,denumite catepsine,acţionează la pH slab acid.Se cunosc cinci tipuri de catepsine notate A,B,C,D şi E.Ele se deosebesc una de alta după specificitatea de substrat,pH optim etc.

Un grup deosebit de proteinaze intracelulare cu pH optim în domeniul alcalin îl alcătuiesc kininogeninele(kallikreinele) din

glandele salivare şi pancreas,renina din rinichi,angiotensinazele din plasma sanguină şi alte ţesuturi.Aceste enzime sînt implicate în eliberarea unor peptide hormonale din precursorii lor.

Enzimele proteolitice intracelulare pot participa în catabolismul proteinelor din ţesuturile animale,furnizînd peste 30-50% din aminoacizii necesari proceselor biosintetice.Apoi,proteoliza intracelulară poate avea rol important într-o serie de procese specifice,de exemplu,metamorfoza la insecte şi vertebrate,imunitatea naturală,formarea şi scindarea substanţelor fiziologic active(formarea tiroxinei şi 3,5,3'-triiodotironinei din tiroglobulină,sinteza insulinei din proinsulină etc.).

Plasma şi elementele figurate ale sîngelui conţin o gamă complexă de enzime proteolitice a căror acţiune coordonată se află la baza unor importante procese fiziologice ca,de exemplu, coagularea sîngelui,prevenirea şi liza trombelor în vasele sanguine,formarea şi scindarea peptidelor biologic active,fagocitoza etc.

Intre enzimele proteolitice din sînge menţionăm următoarele:

Trombina realizează conversia fibrinogenului în fibrină. Trombina se găseşte în plasma sanguină sub forma zimogenului numit protrombină.

Plasmina(fibrinolizina) este unul din componenţii principali ai sistemului de anticoagulare.

Enzimele proteolitice ale plantelor şi microorganismelor

Plantele conţin peptid-hidrolaze atît în organele vegetative(frunze,tulpini,rădăcini) cît şi în fructe sau seminţe.In seminţele aflate în starea de germinare,scindarea proteinelor de rezervă ale endospermului sau cotiledoanelor are loc cu deosebită intensitate şi conduce la formarea aminoacizilor şi altor substanţe azotate micromoleculare din care se sintetizează proteinele embrionului în dezvoltare.Proteoliza se observă şi în procesul de îmbătrînire a plantelor cînd se scindează proteinele organelor vegetative,aminoacizii rezultaţi migrînd în organele de reproducere unde decurge intens biosinteza proteinică.

Multe din proteinazele vegetale sînt enzime tiolice,conţi-

nînd în centrul lor activ o grupă -SH.Ca exemple de proteinaze vegetale tiolice avem bromelina din ananas,ficina din latexul de ficus,papaina din Carica papaya etc.

Multe din microorganismele cunoscute pot sintetiza peptid-hidrolaze cu pH optim de acţiune în mediul acid,neutru sau alcalin şi cu rezistenţă deosebită la temperatură(termostabile).Lista peptid-hidrolazelor microbiene cuprinde atît proteinaze cît şi peptidaze.Unele proteinaze au specificitate unică.De exemplu: keratinaza,colagenaza etc.

Funcţia cea mai evidentă a peptid-hidrolazelor sintetizate de microorganisme constă în hidroliza proteinelor din mediul înconjurător,cu formarea de produşi capabili să pătrundă uşor în celula microbiană.Probabil,majoritatea proteinazelor microorganismelor funcţionează ca enzime extracelulare,fiind eliminate în mediul de cultură,iar peptidazele în cele mai multe cazuri sînt enzime intracelulare.

12. METABOLISMUL PROTEINELOR COMPLEXE

Pe lîngă proteinele simple(holoproteine) în organismele vii se află proteinele complexe sau conjugate(heteroproteinele) care conţin în compoziţia lor un component neproteinic numit grupare prostetică. Metabolismul proteinelor complexe se deosebeşte de metabolismul proteinelor simple prin acele transformări care sînt caracteristice grupării prostetice.

12.1. METABOLISMUL NUCLEOPROTEINELOR

Transformările biochimice ale nucleoproteinelor încep cu scindarea acidului nucleic de componentul proteinic. In tubul digestiv descompunerea nucleoproteinelor în proteină şi acid nucleic are loc sub acţiunea enzimelor proteolitice(pepsină, tripsină etc.). Proteina separată din nucleoproteine suferă aceleaşi transformări ca şi proteinele simple. Descompunerea acizilor nucleici este catalizată de enzime specifice.

12.1.1. CATABOLISMUL ACIZILOR NUCLEICI

12.1.1.1. Hidroliza enzimatică a acizilor nucleici.

Legăturile internucleotidice 3',5'-fosfodiesterice în acizii nucleici sînt scindate, fără eliberarea H_3PO_4, sub acţiunea hidrolazelor numite nucleaze. Ele scindează legăturile fosfodiesterice între fosfor şi oxigen :



$$R-O-\overset{O}{\underset{HO}{P}}-O-R_1 + H-{}^{18}O-H \longrightarrow R-O-\overset{O}{\underset{HO}{P}}-{}^{18}OH + R_1-OH$$

Prin ruperea legăturilor fosfodiesterice se pot forma produşi fosforilaţi la capătul 3' sau la capătul 5'.

După specificitatea faţă de acizii nucleici se disting ribonucleaze(RNaze) care hidrolizează ARN, deoxiribonucleaze(DNaze) care descompun ADN şi nucleaze fără specificitate în raport cu pentoza din polinucleotide.

Se cunosc endonucleaze şi exonucleaze(M.Laskowski, 1961).

Exonucleazele scindează atît poliribonucleotidele cît şi polideoxiribonucleotidele prin îndepărtarea succesivă a mononucleotidelor de la unul din capetele catenei polinucleotidice. Exonucleazele pot manifesta o specificitate înaltă după capaci-

tatea lor de a ataca polinucleotidele mono- sau bi-catenare.

In ţesuturile animale, în plante şi microorgansime au fost descoperite variate tipuri de ribonucleaze, aparţinînd endo- sau exo-nucleazelor (tabelul 12.1). Ribonucleazele îndeplinesc în organismul viu diverse funcţii.

Tabelul 12.1. Unele ribonucleaze din diferite surse

Denumirea	Tipul	Substratul	Cofactor	Produşi de scindare
RNaza I	Endonuclează	ARN monocatenar	-	3'-Mononucleotide
RNaza II	Exonuclează	ARN monocatenar	K^{+}, Mg^{2+}	5'-Mononucleotide şi oligonucleotide
RNaza III	Endonuclează	ARN bicatenar	K^{+}, Mg^{2+}	Oligonucleotide 3'-fosforilate (10-25 perechi de nucleotide)
RNaza IV	Endonuclează	R17-ARN	-	Două fragmente specifice
RNaza P	Endonuclează (specifică)	Precursorul ARN_t	Mg^{2+}, Mn^{2+}, K^{+}, NH_4^{+}	ARN_t şi fragmente
RNaza H	Endonuclează	Catena ARN în hibridul ADN-ARN	K^{+}, Mg^{2+}	Oligonucleotide 5'-fosforilate
Oligo-RNaza	Exonuclează	Oligoribonucleotide scurte	Mn^{2+}	5'-Mononucleotide
Polinucleotid-fosforilaza	Exonuclează (3'→5')	ARN monocatenar	Mg^{2+}	5'-Nucleoziddifosfaţi

Astfel ribonucleaza pancreatică (RNaza I din pancreasul de bovine) are pH optim de acţiune 7,7 şi descompune ARN din hrană. RNaza I se întîlneşte în toate celulele vii şi hidrolizează surplusul de ARN pînă la 3'-mononucleotide. RNazele II, III, IV, P şi H, existente în unele ţesuturi animale, E.coli etc., catalizează scindarea posttranscripţională a precursorilor ARNm, ARNr şi ARNt în formele funcţionale corespunzătoare.

Multe RNaze sînt capabile să recunoască secvenţe nucleotidi-

ce strict determinate şi să taie punţile fosfodiesterice numai în aceste locuri.

Cele mai cunoscute endodeoxiribonucleaze sînt DNaza I şi DNaza II.

DNaza I(DNaza pancreatică) manifestă o activitate optimă la pH neutru(7-8) şi necesită ionii Mg^{2+},Mn^{2+},Co^{2+} ca activatori. DNaza II,conţinută preponderent în splină şi timus,posedă un pH optim cuprins între 4 şi 5.

DNaza I clivează preferenţial legăturile fosfodiesterice între nucleotidele purinice şi pirimidinice din molecula ADN.Acţionînd asupra legăturii dintre C-3' şi fosfor,DNaza I fragmentează ADN în oligonucleotide avînd în poziţia 5' restul de acid fosforic.DNaza II cresteazã punţile fosfodiesterice în ambele catene de ADN,eliberînd oligonucleotide avînd 5'-OH liber şi un rest de acid fosforic în poziţia 3'.

Intre exonucleazele ADN specifice(fosfodiesteraze) se menţionează următoarele.

Exonucleaza I din E.coli scindează ADN monocatenar de la capătul 3' cu formarea de deoxiribonucleozid-5'-monofosfaţi.

Exonucleaza III din E.coli hidrolizează ADN bicatenar de la capătul 3' cu eliberarea de 5'-mononucleotide.

Exonucleaza II sau exonucleaza legată cu ADN-polimeraza I din E.coli şi exonucleaza IV,răspunzătoare de scindarea exonucleazică a ADN în direcţiile 3'→5',respectiv 5'→3',joacă rol important în mecanismele replicării şi reparării ADN.

O serie de exonucleaze se utilizează ca instrumente analitice pentru cercetarea ADN şi ARN sau pentru obţinerea de nucleozid-5'-monofosfaţi şi nucleozid-3'-monofosfaţi.

Endonucleazele de restricţie(restrictazele) reprezintă endodeoxiribonucleaze cu o înaltă specificitate de recunoaştere a substratului.Ele atacă ADN numai în cîteva puncte(sau alături cu acestea) pentru care este caracteristică o secvenţă unică de nucleotide.Restrictazele intră în compoziţia sistemului celular protector de restricţie-modificaţie,din care cauză ele sînt capabile să scindeze ADN străin nemodificat(de exemplu,ADN viral) şi nu acţionează asupra ADN propriu,întrucît ultimul se deosebeşte prin caracterul modificaţiei.

In prezent s-au izolat peste 350 de restrictaze din multe specii de bacterii,care descompun ADN în mai mult de 80 fragmente de lungime determinată cu secvenţe specifice.

Denumirea restrictazelor se alcătuieşte din numele prescurtate ale bacteriilor şi sugelor,iar cifrele romane indică că din sursa respectivă s-au izolat mai multe enzime.In tabelul 12.2 se enumeră unele restrictaze,provenienţa şi specificitatea lor.

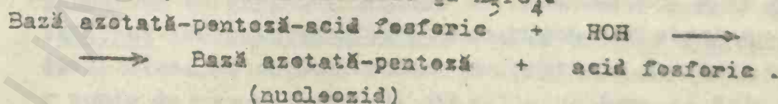
Tabelul 12.2.Unele restrictaze şi specificitatea lor

Denumirea	Sursa	Specificitatea
Eco R I	E.coli	↓GAATTC
Eco R II	E.coli	↓CC($\frac{A}{T}$)GG
Hae I	Haemophilus aegypticus	($\frac{A}{T}$)GG↓CC($\frac{T}{A}$)
Hae II	" "	PuGCGC↓Py
Hae III	" "	GG↓CC
Hha I	Haemophilus haemolyticus	GCC↓C
Hind III	Haemophilus influenzae	A↓AGCTT
Hipa I	Haemophilus parainfluenzae	GTT↓AAC
Hipa II	" "	C↓CGG
Mbo I	Moraxella bovis	↓GATC
Mne I	Moraxella nonliquefaciens	C↓CGG
Sma I	Serratia marascens	CCC↓GGG
BSVR I	Bacillus subtilis	GG↓CC

Restrictazele au largi utilizări în determinarea structurii primare a ADN,cartarea genetică a cromozomilor,construirea şi clonarea moleculelor hibride de ADN(inginerie genetică) etc.

12.1.1.2.Hidroliza enzimatică a nucleotidelor şi nucleozidelor

Mononucleotidele,rezultate prin scindarea acizilor nucleici, sînt descompuse în nucleozide şi H_3PO_4:


Bază azotată-pentoză-acid fosforic + HOH ⟶

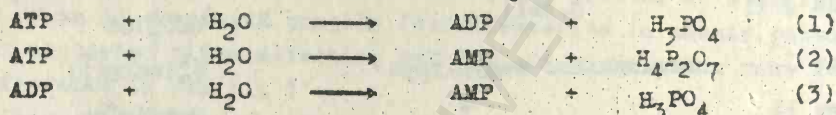
⟶ Bază azotată-pentoză + acid fosforic .
(nucleozid)

Acest proces poate fi catalizat de fosfomonoesteraze nespecifice sau de hidrolaze specifice.Aparţin primului tip fosfomonoesteraza

alcalină sau fosfataza alcalină cu pH optim în mediul alcalin şi fosfomonoesteraza acidă sau fosfataza acidă care are pH optim în domeniul acid.

Intre hidrolazele specifice care atacă mononucleotidele avem 5'-nucleotidaza care hidrolizează 5'-nucleotidele şi 3'-nucleotidaza cu o largă specificitate faţă de 3'-nucleotide.

Scindarea nucleozidtrifosfaţilor şi nucleoziddifosfaţilor în nucleozidmonofosfaţi este catalizată de enzime specifice. De exemplu, hidroliza ATP şi ADP are loc pe calea reacţiilor catalizate de ATP-fosfohidrolază (ATP-ază) (reacţia 1), ATP-pirofosfohidrolază (reacţia 2) şi nucleoziddifosfatază (reacţia 3):



$$ATP + H_2O \longrightarrow ADP + H_3PO_4 \quad (1)$$
$$ATP + H_2O \longrightarrow AMP + H_4P_2O_7 \quad (2)$$
$$ADP + H_2O \longrightarrow AMP + H_3PO_4 \quad (3)$$

Dinucleotidele (NAD^+, FAD etc.) sînt clivate la mononucleotide de către nucleotid-pirofosfatază.

Nucleozidele pot fi hidrolizate în baze azotate şi pentoze sub influenţa nucleozidazelor, care pot rupe legătura N-glicozidică şi la nivelul nucleotidelor. Nucleozidele pot fi descompuse şi prin transferul restului de pentoză la acidul fosforic, obţinîndu-se baza azotată şi pentozofosfatul.

In diferite ţesuturi animale au fost evidenţiate fosfodiesteraze care hidrolizează legătura fosfodiesterică în 3',5'-nucleotidele ciclice cu formarea 5'-nucleotidelor corespunzătoare.

12.1.1.3. Catabolismul bazelor purinice şi pirimidinice

Bazele purinice şi pirimidinice, rezultate prin hidroliza nucleozidelor şi nucleotidelor, pot participa la sinteza de noi nucleotide sau sînt catabolizate în continuare.

Catabolismul bazelor purinice începe cu dezaminarea lor hidrolitică, urmată de oxidarea produşilor de dezaminare la acid uric. Adenina este transformată de adenindezaminază în hipoxantină, iar guanina trece sub acţiunea guanindezaminazei în xantină. Apoi are loc oxidarea hipoxantinei în xantină, care la rîndul ei se oxidează pînă la acid uric (fig.12.1). Oxidarea atît a hipoxantinei cît şi a xantinei este catalizată de enzima flavinică xantinoxidaza care conţine Cu şi Mo şi utilizează O_2.

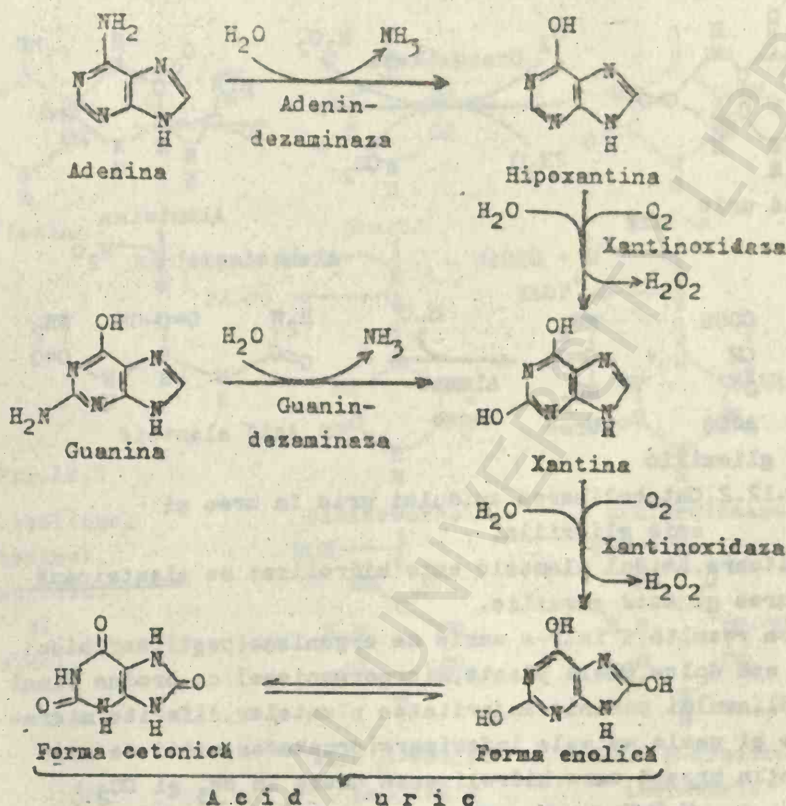


Fig.12.1.Degradarea bazelor purinice la acid uric.

Acidul uric este produsul final al catabolismului bazelor purinice la om şi primate.La unele reptile(şerpi,şopîrle) şi la păsări azotul se elimină din organism în principal sub formă de acid uric.Celelalte organisme conţin enzima uratoxidaza capabilă să oxideze acidul uric la alantoină(fig.12.2) care este produsul final al catabolismului bazelor purinice la mamiferele inferioare, la diferite reptile şi la unele moluşte.

In organismele animalelor inferioare,în unele microorganisme şi în multe plante superioare se întîlneşte enzima alantoinaza care descompune hidrolitic alantoina în acid alantoic.El este produsul final al metabolismului purinic la unii peşti(Teleostei) şi o serie de plante(bob,soia etc.).La majoritatea celorlalte specii

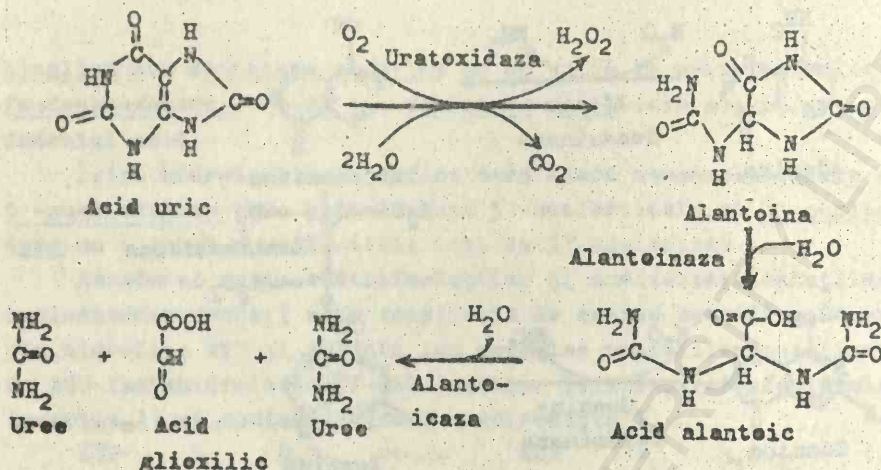


Fig.12.2. Catabolizarea acidului uric în uree şi acid glioxilic.

de vieţuitoare, acidul alantoic este hidrolizat de alantoicază pînă la uree şi acid glioxilic.

Ureea rezultă într-o serie de organisme (peşti, amfibieni, midii de apă dulce, unele plante, microorganisme) ca produs final al catabolismului purinic. Majoritatea plantelor, diferite microorganisme şi unele animale inferioare (crustacee, midii de mare etc.) conţin urează care hidrolizează ureea în NH_3 şi CO_2 :



$$H_2N-\underset{\underset{O}{\parallel}}{C}-NH_2 + H-O-H \longrightarrow NH_3 + O{=}C{=}O + NH_3 .$$

Catabolismul citozinei cuprinde mai întîi dezaminarea ei hidrolitică la uracil (fig.12.3). Calea de scindare a uracilului şi timinei are loc cu formarea dihidropirimidinelor respective, urmată de deschiderea inelului pirimidinic conducînd la acizii β-ureidoalcanoici corespunzători care se vor descompune în β-aminoacizi (fig.12.3).

Uracilul se reduce sub acţiunea dihidrouracildehidrogenazei în 5,6-dihidrouracil. Enzima din bacterii foloseşte NAD^+ drept coenzimă, iar enzima de provenienţă animală lucrează cu $NADP^+$. Apoi, enzima dihidropirimidinhidraza scindează ciclul pirimidinic între N-3 şi C-4, rezultînd acidul β-ureidopropionic (carbamil-β-alanina). Prin hidroliza ultimului compus se obţine β-alanina, CO_2

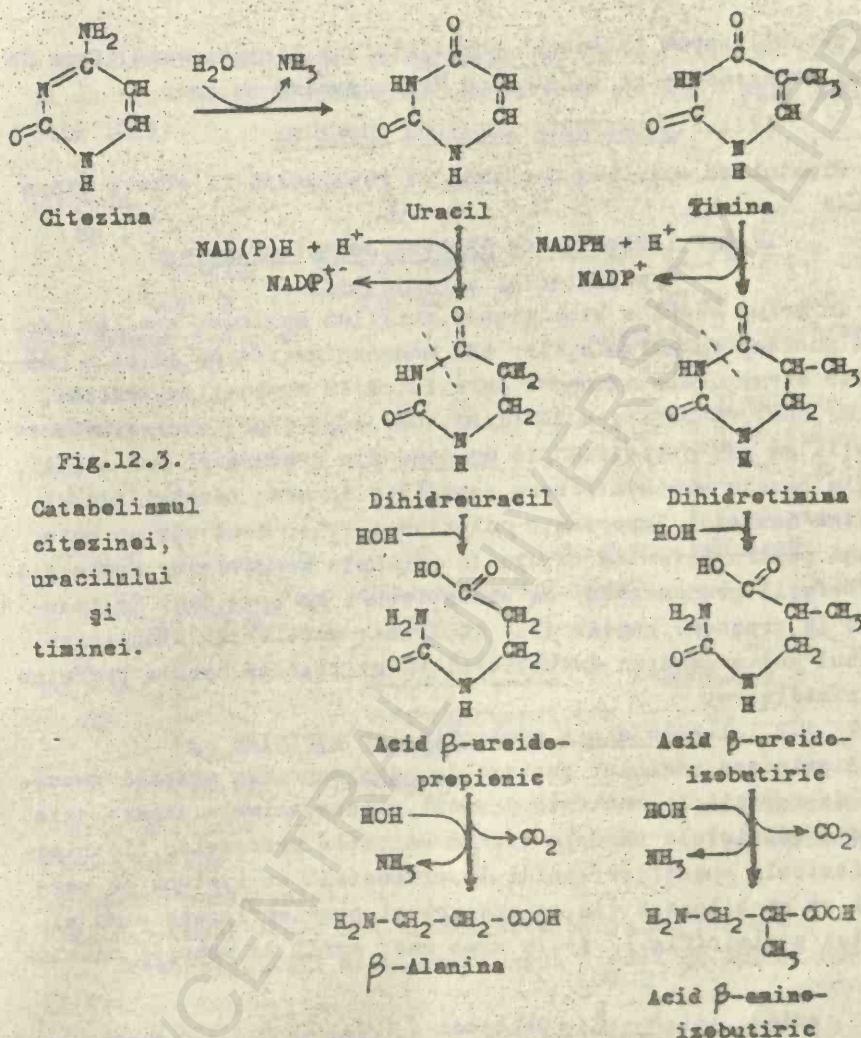


Fig.12.3.
Catabolismul citozinei, uracilului şi timinei.

şi NH_3.

Catabolismul timinei decurge în mod analog, însă ca produşi intermediari apar dihidrotimina şi acidul β-ureidoizobutiric care se descompune în acid β-aminoizobutiric(α-metil-β-alanină), NH_3 şi CO_2. β-Alanina şi acidul β-aminoizobutiric constituie produşii finali ai catabolismului bazelor pirimidinice. Amoniacul format

prin catabolizarea citozinei,uracilului şi timinei este atras în ciclul ureogenetic şi se elimină din organism ca uree.

12.1.2.BIOSINTEZA ACIZILOR NUCLEICI

Biosinteza acizilor nucleici se realizează în cîteva etape de bază.

12.1.2.1.Biosinteza nucleozidmonofosfaţilor purinici şi pirimidinici

In prima etapă a biosintezei acizilor nucleici are loc formarea nucleozidmonofosfaţilor sau mononucleotidelor,adică a unităţilor structurale monomere care intră în compoziţia ARN(AMP, GMP,CMP,UMP),respectiv a ADN(dAMP,dGMP,dCMP,dTMP).Nucleozidmonofosfaţii se pot sintetiza fie de novo din precursori mai simpli, fie din bazele azotate libere rezultate în urma catabolismului acizilor nucleici.Importanţa relativă a celor două căi nu este aceeaşi pentru diferite celule.In organele mamiferelor nucleozidmonofosfaţii preponderent se sintetizează de novo,deşi în ţesuturile în creştere rapidă sînt implicate ambele căi.Dimpotrivă, în cazul multor specii de bacterii se utilizează bazele purinice şi pirimidinice.

12.1.2.1.1.Biosinteza nucleotidelor purinice

Biosinteza inelului purinic de novo cuprinde aceeaşi succesiune de reacţii la bacterii,drejdii,plante,animale.Acesta este unul din multiplele exemple vizînd unitatea proceselor biochimice principale specifice viului.Experimentele cu izotopi au permis să se stabilească din ce precursori provin fiecare atom al inelului purinic(fig.12.4).In urma unei serii de reacţii catali-

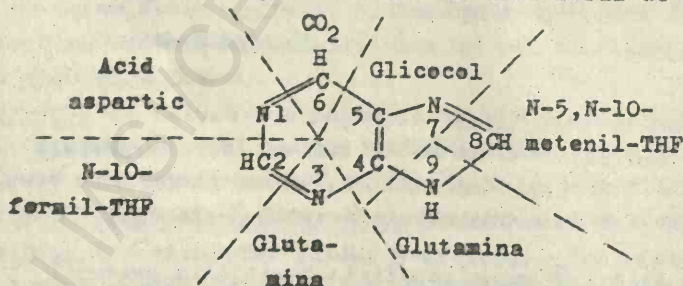


Fig.12.4. Provenienţa atomilor în inelul purinic.

zate de enzime specifice are loc construirea pe D-riboze-5-fosfat

a scheletului moleculei de <u>hipoxantină</u>. Ca rezultat se sintetizează nu baza azotată liberă, ci nucleotidul ei, numit <u>acid</u> <u>inozinic</u> (fig.12.5).

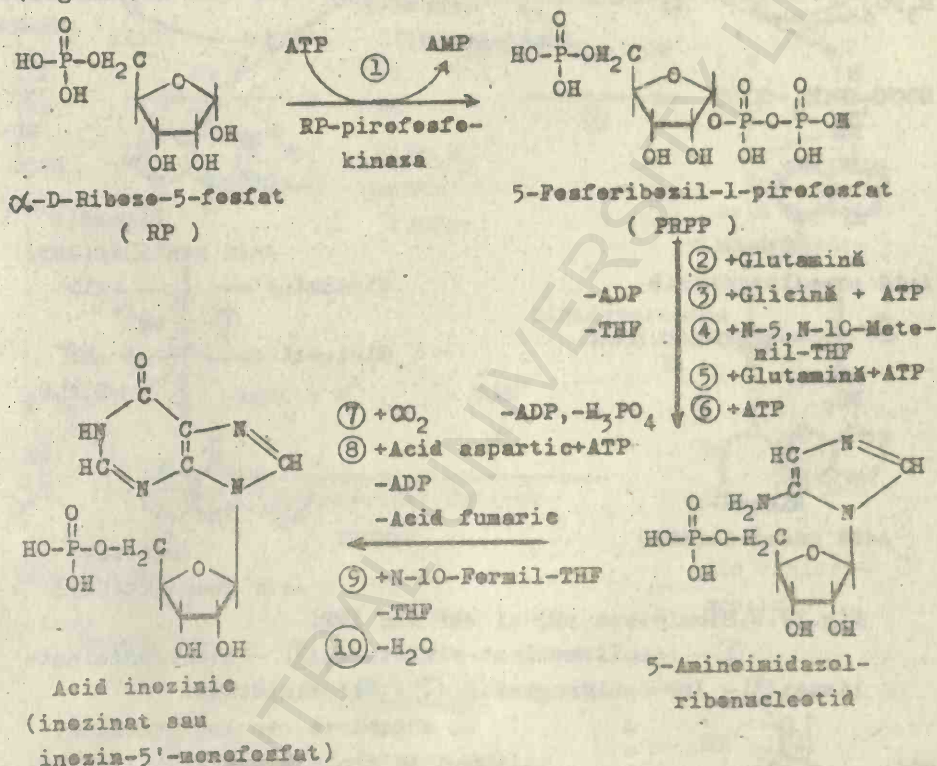


Fig.12.5. Unele etape ale biosintezei inelului purinic.

Inozinatul(IMP) este precursorul direct al AMP şi GMP(fig. 12.6).

12.1.2.1.2. <u>Biosinteza</u> <u>nucleotidelor</u> <u>pirimidinice</u>

In acest caz, spre deosebire de biosinteza nucleotidelor purinice, mai întîi are loc formarea inelului pirimidinic care apoi reacţionează cu PRPP rezultînd un nucleotid pirimidinic. Ca precursori în biosinteza inelului pirimidinic servesc NH_3, CO_2 şi acidul aspartic(fig.12.7).

Prima reacţie în sinteza nucleotidelor pirimidinice constă în formarea <u>carbamoilfosfatului</u> care apare de asemenea ca intermediar în sinteza ureei.

Aspartat
GTP
GDP
H_3PO_4
Mg^{2+}
①
Inozinat(IMP)
Riboză-P
$NADH+H^+$
H_2O
③
NAD^+
$HOOC-\overset{H}{C}-CH_2-COOH$
NH
Riboză-P
Acid adenilosuccinic
②
$HOOC-\overset{H}{C}=\underset{H}{C}-COOH$
NH_2
Riboză-P
Acid adenilic(AMP)
Riboză-P
Acid xantilic(XMP)
Glutamină
ATP
④
Mg^{2+}
Glutamat
AMP
$H_4P_2O_7$
H_2N
Riboză-P
Acid guanilic(GMP)

Fig.12.6.Biosinteza AMP și GMP din IMP.
① - Adenilsuccinat-sintetaza; ② - Adenilsuccinat-liaza; ③ - IMP-dehidrogenaza; ④ - GMP-sintetaza.

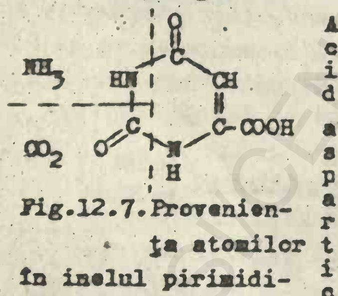


Fig.12.7.Proveniența atomilor în inelul pirimidinic.

La eucariote, carbamoilfosfatul utilizat în sinteza pirimidinelor se formează în citosol sub acțiunea unei carbamoilfosfat-sintetaze specifice (reacția 1 în fig.12.8).

Enzima aspartat-carbamoiltransferaza catalizează formarea acidului N-carbamoilaspartic(acidul ureidosuccinic) din carbamoilfosfat și acid aspartic(reacția 2, fig.12.8). Mai departe acidul carbamoilaspartic se ciclizează rezultînd acidul dihidroorotic care se dehidrogenează dînd inelul pirimidinic sub forma acidului orotic.

Următorul stadiu în sinteza nucleotidelor pirimidinice cuprinde reacția acidului orotic cu PRPP conducînd la primul nucleotid - orotidin-5'-monofosfatul(OMP). Prin decarboxilarea OMP se obține un nucleotid pirimidinic major, uridin-5'-monofosfatul(UMP)(fig.12.8).

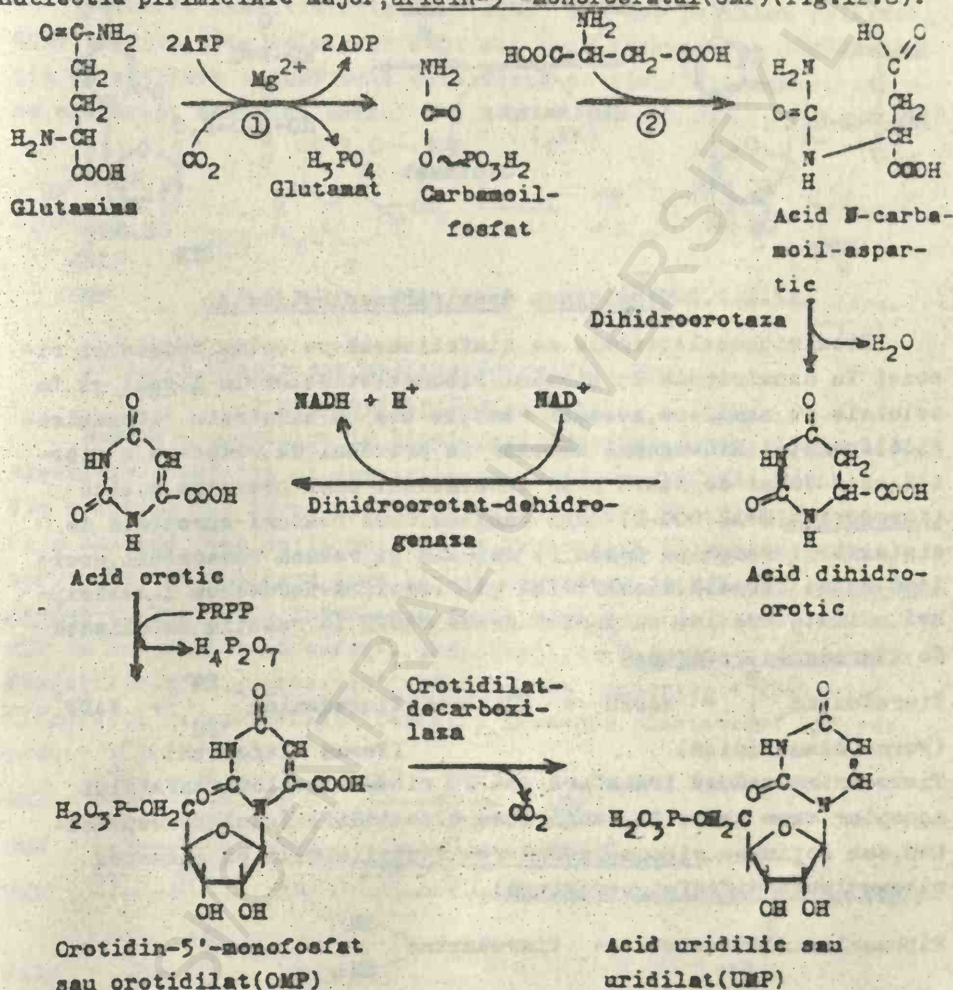
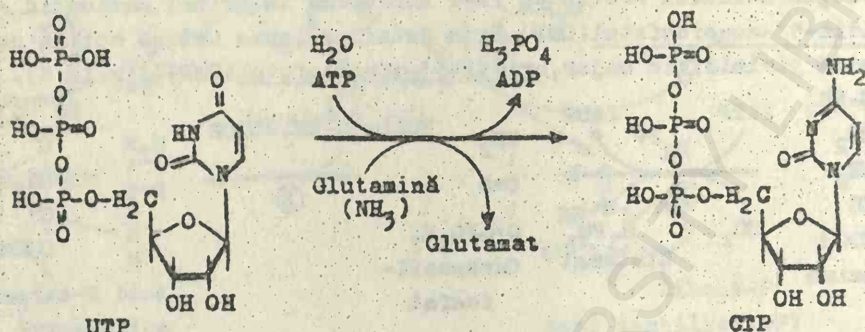


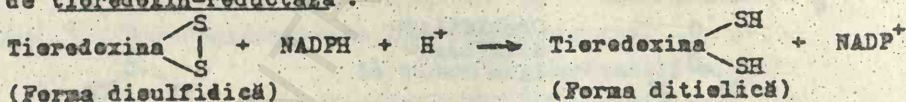
Fig.12.8. Schema biosintezei uridin-5'-monofosfatului(UMP).

UMP servește ca precursor în sinteza celorlalte nucleotide pirimidinice. CTP se sintetizează pe calea aminării UTP cu ajutorul glutaminei la mamifere, iar la bacterii este utilizat NH_3 :

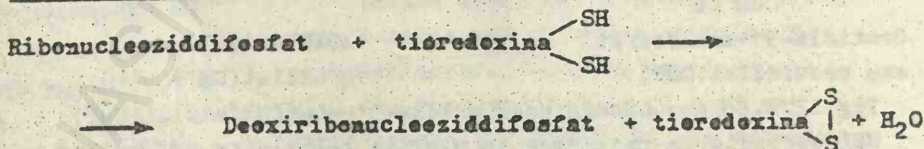


12.1.2.2.Biosinteza deoxiribonucleotidelor

Deoxiribonucleotidele se sintetizează pe calea reducerii ribozei în deoxiriboză la nivelul ribonuclotidelor.In E.coli şi în celulele de mamifere,această reacţie are ca substrate ribonucleoziddifosfaţii.Hidrogenul necesar în procesul de reducere a ribozei este donat de NADPH prin intermediul unei proteine numită tioredoxină(M=12.000 D) care conţine două resturi apropiate de cisteină.Tioredoxina poate fi oxidată şi redusă reversibil,oscilînd între formele disulfidică şi ditiolică.Reducerea tioredoxinei oxidate are loc cu participarea NADPH în reacţia catalizată de tioredoxin-reductază :



Tioredoxina redusă transferă cei 2H ribonucleoziddifosfatului acceptor care trece în deoxiribonucleoziddifosfatul corespunzător,sub acţiunea ribonucleotid-reductazei(numită de asemenea ribonucleoziddifosfat-reductază) :

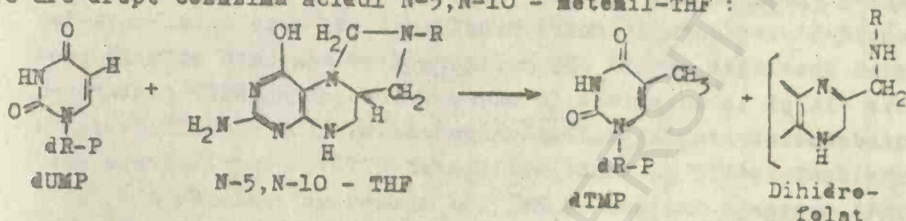


In afară de tioredoxină,rolul de donor de hidrogen poate fi îndeplinit de glutationul redus.Glutation-reductaza catalizează reducerea glutationului oxidat(forma disulfidică) cu ajutorul NADPH.Pentru transferul hidrogenului de la glutationul redus la

ribonucleotid-reductază este necesară o nouă proteină numită <u>glutaredoxină</u>.

Prin reducerea ADP,GDP,CDP şi UDP,catalizată de sistemele enzimatice corespunzătoare,rezultă dADP,dGDP,dCDP şi dUDP.

Formarea deoxitimidilatului(dTMP) are loc pe calea metilării dUMP obţinut prin scindarea dUDP sau prin dezaminarea dCMP.Reacţia de metilare a dUMP este catalizată de timidilat-sintetază care are drept coenzimă acidul N-5,N-10 - metenil-THF :



12.1.2.3.<u>Biosinteza nucleoziddifosfaţilor şi nucleozidtrifosfaţilor</u>

Pentru a participa în biosinteza acizilor nucleici,ribonucleozidmonofosfaţii şi deoxiribonucleozidmonofosfaţii,trebuie să fie activaţi sub formă de nucleozidtrifosfaţi.Reacţiile de formare a acestor combinaţii mai bogate în energie au loc cu participarea ATP,sub acţiunea unor <u>kinaze</u> specifice.Astfel,<u>nucleozidmonofosfat-kinaza</u> catalizează transferul unui rest de fosfat de la ATP la nucleozidmonofosfaţii menţionaţi,cu formarea nucleoziddifosfaţilor.Apoi,<u>nucleoziddifosfat-kinaza</u> converteşte nucleoziddifosfaţii în nucleozidtrifosfaţii necesari biosintezei ARN,respectiv ADN(fig.12.9).

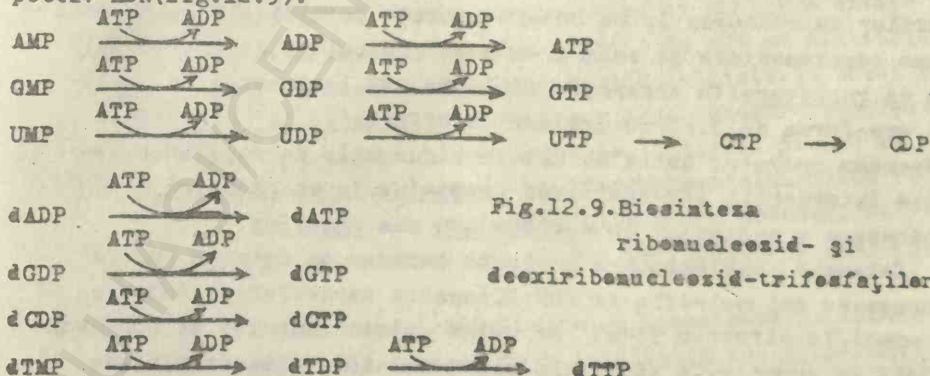


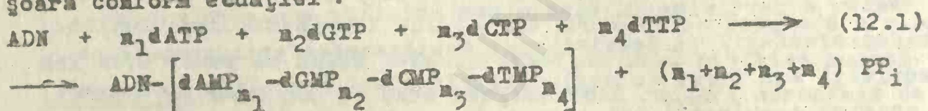
Fig.12.9.Biosinteza ribonucleozid- şi deoxiribonucleozid-trifosfaţilor.

12.1.2.4. Biosinteza acizilor nucleici

In ultima etapă a biosintezei acizilor nucleici are loc polimerizarea nucleozidtrifosfaţilor în polinucleotide.

12.1.2.4.1. Biosinteza acidului deoxiribonucleic

In celula vie ADN se sintetizează din monomeri (deoxiribonucleozid-5'-monofosfaţi = dNuMP) activaţi sub formă de deoxiribonucleozid-5'-trifosfaţi (dNuTP). Biosinteza ADN este catalizată de o enzimă specifică, numită ADN-polimerază, evidenţiată atît la procariote cît şi la eucariote. In afara celor patru dNuTP precursori (deoxiadenozintrifosfat=dATP, deoxiguanozintrifosfat=dGTP, deoxicitidintrifosfat=dCTP şi timidintrifosfat=dTTP), ADN-polimeraza mai necesită prezenţa ionilor de Mg^{2+} şi a unei molecule de ADN cu rol de matriţă. Sinteza legăturilor fosfodiesterice între resturile de deoxiribonucleotide, sub acţiunea ADN-polimerazei, se desfăşoară conform ecuaţiei :



$$ADN + n_1 dATP + n_2 dGTP + n_3 dCTP + n_4 dTTP \longrightarrow \quad (12.1)$$

$$\longrightarrow ADN-\left[dAMP_{n_1}-dGMP_{n_2}-dCMP_{n_3}-dTMP_{n_4}\right] + (n_1+n_2+n_3+n_4)\ PP_i$$

Succesiunea de polimerizare a deoxiribonucleotidelor este determinată de matriţa de ADN. Intrucît în ecuaţia 12.1 participă ca matriţă o moleculă preexistentă, biosinteza ADN este un proces de tip replicativ sau de tip copiere şi se numeşte replicarea ADN.

Replicarea ADN se bazează pe un mecanism complex care presupune în primul rînd despiralizarea dublu helixului, ruperea legăturilor de hidrogen între bazele azotate perechi ale celor două catene complementare şi separarea acestora cel puţin într-o unitate de replicare. Ca urmare, molecula de ADN la punctul de replicare are forma de Y, structură numită bifurcaţie de replicare. Desfacerea spiralei duble de ADN în bifurcaţie de replicare necesită intervenţia aşa-numitelor „proteine de dezrăsucire a ADN", de asemenea a enzimelor de desfăşurare sau relaxare.

Catenele complementare separate servesc ca matriţe pentru formarea de noi molecule de ADN. Elongaţia catenelor de ADN are loc numai în direcţie 5'→3', pe calea unirii restului de fosfat α a dNuTP la grupele-OH terminale ale catenelor polideoxiribonu-

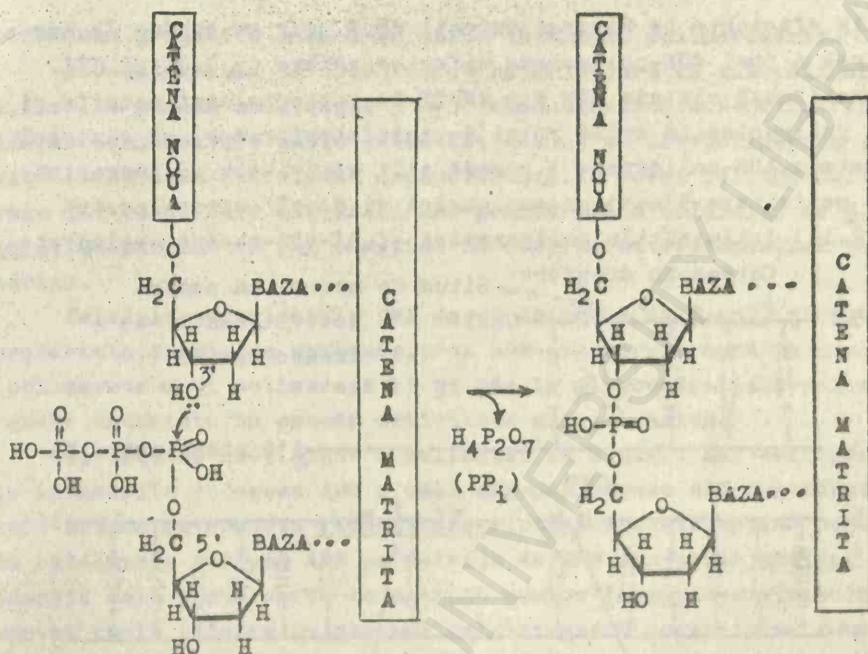


Fig.12.10.-Sinteza catenei de ADN sub acţiunea ADN-polimerazei. Concomitent cu formarea legăturii 3',5'-fosfodiesterice se scindează pirofosfatul(PP_i).

cleotidice în creştere(fig.12.10).ADN-polimeraza catalizează formarea legăturii fosfodiesterice numai dacă baza deoxiribonucleozidtrifosfatului este complementară cu baza din matriţă,conform regulilor de împerechere a nucleotidelor în molecula de ADN.Intrucît între bazele pirimidinice şi purinice există o corespondenţă strictă,pe fiecare matriţă de ADN se sintetizează o catenă nouă,complemetară,de compoziţie iniţială.In acest fel, dintr-o moleculă de ADN iau naştere două molecule absolut identice între ele,precum şi cu molecula iniţială.Fiecare moleculă nouă de ADN conţine o catenă polideoxiribonucleotidică veche(matriţa) şi o catenă nou-sintetizată.De aceea procesul de biosinteză descris se cunoaşte sub numele de <u>replicarea semiconservativă a ADN</u>.

Multe informaţii referitoare la mecanismul replicării semiconservative a ADN s-au obţinut în ultimii 15-20 ani.Astfel cer-

cetările efectuate pe diverşi mutanţi de E.coli au condus la descoperirea a trei ADN-polimeraze diferite,notate cu I,II şi III. Ele catalizează sinteza ADN din dNuTP în prezenţa unei matriţe şi a unui polinucleotid avînd rolul de iniţiator(primer) al sintezei noii catene.ADN-polimeraza I posedă atît activitate polimerazică cît şi activitate 3'→5'-exonucleazică şi 5'→3'-exonucleazică (fig.12.11).Activităţile polimerazică şi 5'→3'-exonucleazică ale

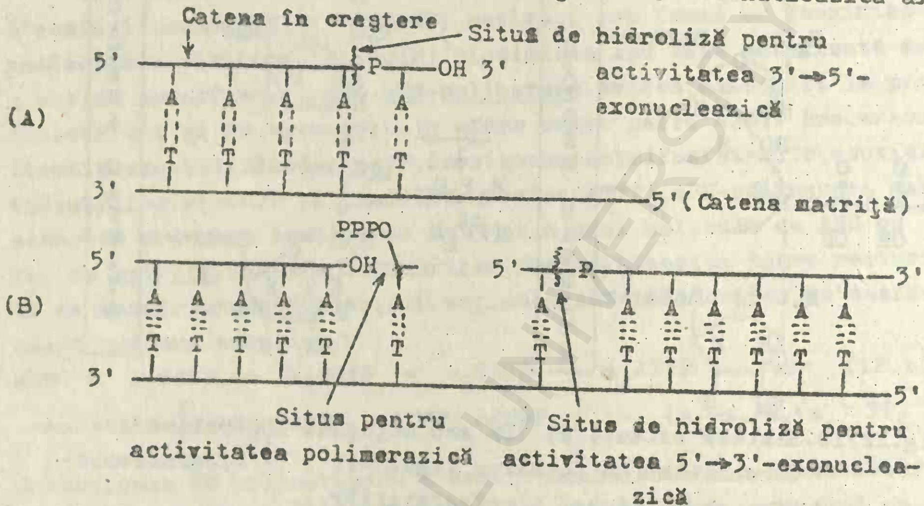


Fig.12.11. Cele trei tipuri de activitate catalitică ale ADN-polimerazei I.
(A) : Activitatea 3'→5'-exonucleazică sau activitatea „corectoare" a enzimei.
(B) : Reacţia de polimerizare şi acţiunea 5'→3'-exonucleazică.

ADN-polimerazei I se pot manifesta coordonat,catalizînd simultan polimerizarea unui nucleotid la capătul 3' şi scindarea unui nucleotid de la capătul 5' într-o singură catenă ruptă a ADN bicatenar.Activitatea 5'→3'-exonucleazică joacă un rol important în excizia dimerilor pirimidinici care se formează în urma iradierii cu raze ultraviolete a ADN.Deci,ADN-polimeraza I poate să aibă un rol esenţial în repararea ADN.

Activitatea 3'→5'-exonucleazică,corelată cu activitatea polimerazică a ADN-polimerazei I poate să catalizeze excizia nucleotidelor neîmperecheate cu bazele matriţei şi astfel să

corecteze greşelile care s-au comis în timpul polimerizării.

ADN-polimeraza II este foarte asemănătoare cu ADN-polimeraza I,însă nu posedă activitate 5'→3'-exonucleazică.ADN-polimeraza III,de asemenea,are unele trăsături comune cu ADN-polimeraza I,dar este lipsită de activitate exonucleazică.In acest fel,ADN-polimeraza III constituie adevărata ADN-polimerază a celulelor de E. coli,îndeplinind un rol esenţial în replicarea cromozomului bacterian.

Celulele eucariote,la fel ca şi celulele de E.coli şi alte procariote,conţin,de asemenea,trei ADN-polimeraze: două în nucleu (polimeraza α şi polimeraza β) şi una în mitocondrii.ADN-polimerazele eucariote nu posedă activitate exonucleazică.

Un interes neobişnuit a solicitat în ultimii ani descoperirea în virusurile oncogene ARN a unei ADN-polimeraze ARN-dependentă care adesea se numeşte reverstranscriptază.Această enzimă poate să catalizeze sinteza ADN pe matriţa de ARN.ADN-copie obţinut pe această cale poate servi ca matriţă pentru înmulţirea virusului sau se poate integra în genomul celulei-gazdă,constituind cauza apariţiei tumorilor.Transcrierea inversă reprezintă o violare a dogmei centrale a biologiei moleculare,întrucît reverstranscriptaza condiţionează transferul informaţiei genetice de la ARN la ADN.

12.1.2.4.1.1.Mecanismul molecular al replicării ADN

Deoarece catenele din molecula parentală de ADN sînt antiparalele,structura unei catene este orientată în direcţia de la capătul 5' spre capătul 3',iar structura celeilalte catene de la capătul 3' spre capătul 5'.Acea catenă în bifurcaţia de replicare care are sensul 5'→3' se numeşte catena matriţă conducătoare şi cealaltă catenă cu sensul 3'→5' reprezintă catena matriţă întîrziată.

Cum s-a menţionat deja,toate ADN-polimerazele sintetizează ADN numai în direcţia 5'→3'.De aceea sinteza ADN se realizează diferit pe cele două catene matriţă.Pe catena matriţă conducătoare sinteza ADN este continuă în direcţia 5'→3'.Pe catena matriţă întîrziată sinteza ADN se desfăşoară discontinu,în fragmente scurte ce se asamblează tot în direcţia 5'→3'(fig.12.12).

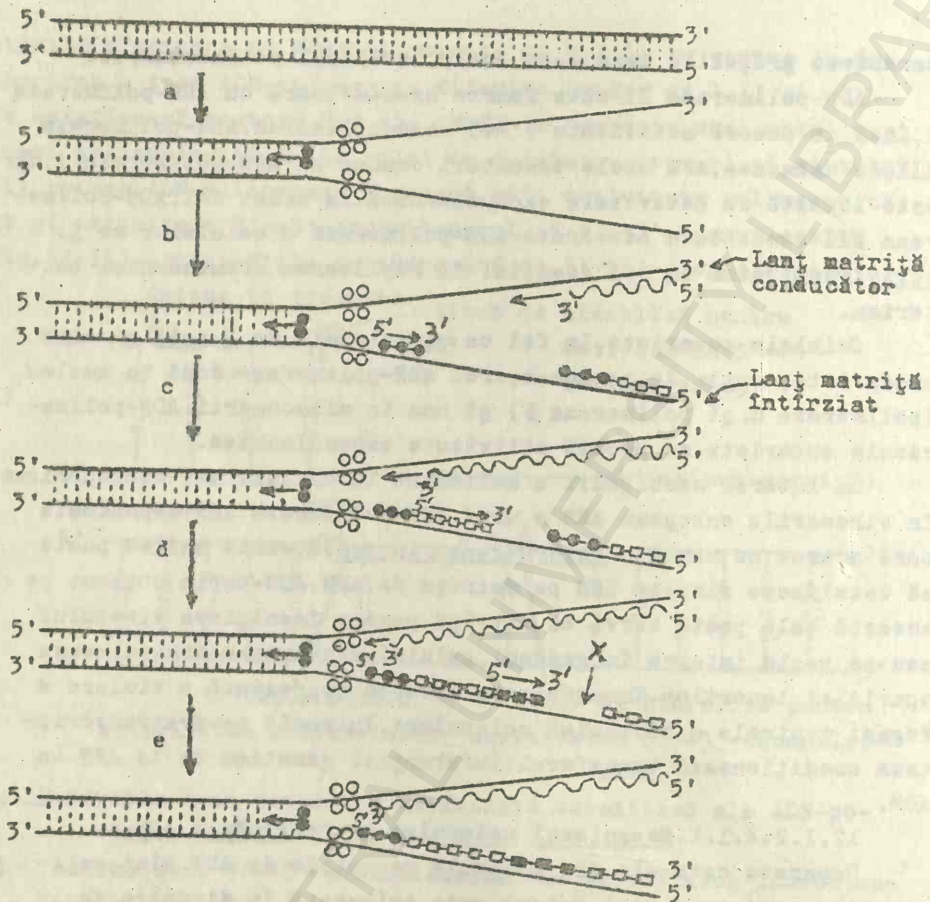


Fig.12.12.Mecanismul probabil al replicării ADN :
a - desfacerea spiralei duble de către helicază(●●) şi stabilizarea catenelor separate cu ajutorul proteinei care leagă ADN (○) ;
b - ARN primer(●-●-●) sintetizat de ARN primază;
c - fragmente Okazaki(●-●-●-□-□-□-□-□),conţinînd atît ADN(□) cît şi ARN(●) şi sintetizate sub acţiunea ADN-polimerazei III ;
d - lanţurile de ADN(□-□-□-■-■-■) formate prin îndepărtarea ARN primer datorită activităţii 5'→3'-exonucleazice a ADN-polimerazei I cu unirea succesivă ulterioară a deoxiribonucleotidelor la capătul 3' sub acţiunea polimerazică a aceleiaşi enzime;
e - legarea lanţurilor de ADN(■-■-■-□-□-□) sub acţiunea ADN-ligazei în porţiunea notată cu litera X.
→ Direcţia sintezei sau acţiunii enzimatice.

Studiile au arătat că sinteza ADN pe catena întîrziată începe cu formarea unor poliribonucleotide scurte(aproximativ 100 de ribonucleotide),denumite ARN primer.Enzima care sintetizează acest tip de ARN se numeşte ARN primază şi este o ARN-polimerază ADN-dependentă care direcţionează sinteza de la capătul 5' spre capătul 3' în catena de ADN în creştere(etapa b în fig.1212).La capătul 3'-OH al ARN primer ADN-polimeraza III sintetizează un segment de ADN complementar catenei matriţă.Cînd segmentul de ADN nou-sintetizat ajunge la circa 1000 de deoxiribonucleotide(la eucariote circa 200 de deoxinucleotide) intervine ADN-polimeraza I care avînd activitate 5'→3'-exonucleazică hidrolizează şi îndepărtează ARN primer din catena ARN-ADN(etapa c în fig.12.12).Indepărtarea ARN din catena în creştere lasă goluri între fragmentele de ADN care sînt denumite fragmente Okazaki(după numele lui Reiji Okazaki,descoperitorul lor).Golurile dintre fragmentele Okazaki sînt completate datorită acţiunii polimerazice a ADN-polimerazei I care alungeşte segmentele de ADN de la capătul 3' aflat mai aproape(etapa d în fig.12.12).In final,fragmentele de ADN sintetizate astfel pe catena întîrziată se unesc,formînd o copie complementară neîntreruptă a catenei matriţă de ADN.Această asamblare decurge sub acţiunea ADN-ligazei,enzimă care catalizează formarea legăturii fosfodiesterice între fragmentele de ADN rezultate(etapa e în fig.12.12),pe seama energiei furnizate de NAD în celula bacteriană sau ATP la bacteriofagi şi în celulele animale(fig.12.13).

Deci,replicarea ADN se desfăşoară continuu pe o catenă şi este un proces discontinuu pe cealaltă catenă,ceea ce poate să explice creşterea simultană în direcţia 5'→3' a ambelor catene în bifurcaţia de replicare.După realizarea replicării intervine ADN-giraza spre a conferi moleculelor nou sintetizate de ADN starea superspiralizată,cerută de rolul lui biologic.

S-a stabilit că replicarea semiconservativă a ADN are un caracter universal,ea fiind specifică atît procariotelor cît şi eucariotelor.Prin acest mecanism informaţia genetică se transmite fidel celulelor fiice,ceea ce asigură,pe de o parte,continuitatea fenomenului ereditar,iar pe de altă parte reproducerea organisme-

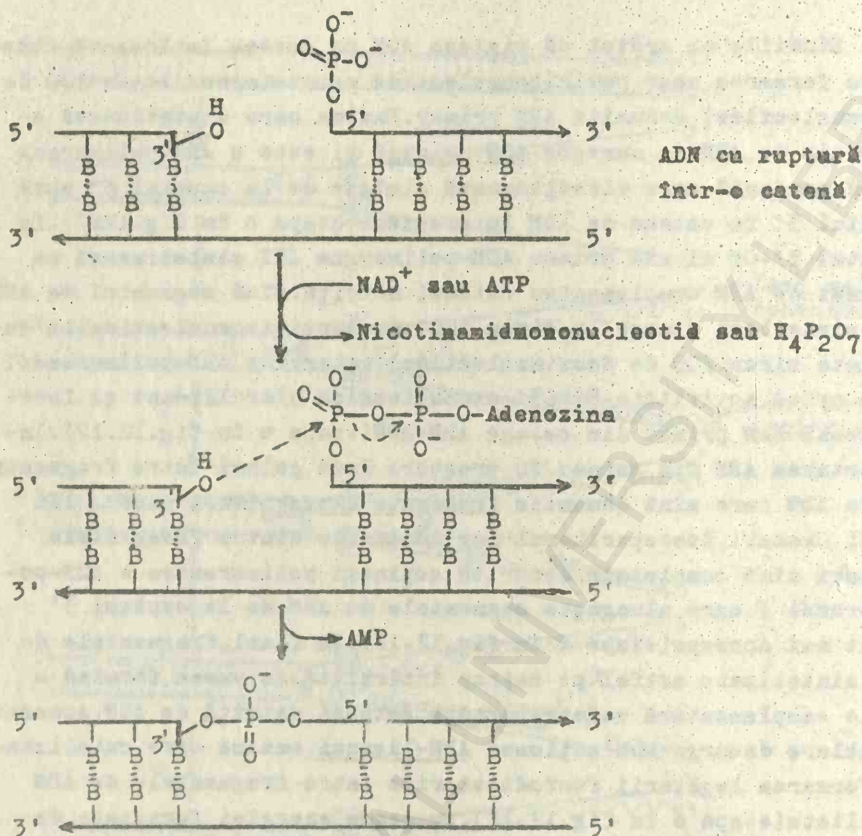


Fig.12.13. ADN-ligaza catalizează joncţiunea fragmentelor de ADN care sînt părţi constituente ale moleculei dublu elicoidale. Această reacţie este esenţială pentru sinteza normală a ADN, pentru repararea leziunilor ADN şi pentru împreunarea catenelor de ADN în recombinarea genetică.

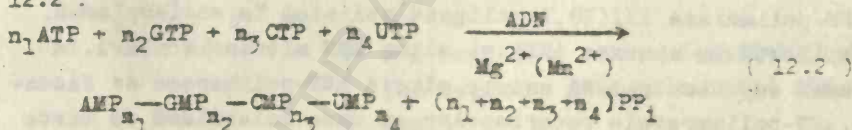
lor. Replicarea ADN în celulele procariotelor este potenţial continuă, în condiţii optime de mediu, pe parcursul întregului ciclu celular. La eucariote replicarea ADN este restrînsă la faza de sinteză S din interfază.

Replicarea ADN se află sub incidenţa unui strict control celular, efectuat la mai multe niveluri. La nivel molecular există mecanisme care asigură corecţia replicării prin îndepărtarea

nucleotidului greşit împerecheat cu nucleotidul complementar din matriţă. Răspunzătoare de această corecţie este ADN-polimeraza I. Greşelile de încorporare a nucleotidelor datorate acţiunii unor agenţi mutageni sau ineficacităţii în activitatea de corectare a ADN-polimerazei I constituie una din căile de apariţie a mutaţiilor, prin care alături de recombinare se asigură variabilitatea necesară procesului evolutiv.

12.1.2.4.2. <u>Biosinteza acizilor ribonucleici</u>

Toate cele trei tipuri de ARN celular (ARN mesager=ARNm, ARN ribozomal=ARNr şi ARN de transfer=ARNt) se sintetizează în cadrul procesului complex numit <u>transcrierea ADN</u>. Acest proces constă în transmiterea informaţiei genetice de la ADN la ARN pe calea reproducerii exacte a secvenţei dezoxinucleotidice din molecula ADN în succesiunea ribonucleotidică a moleculelor de ARN. Biosinteza ARN este realizată de enzima numită <u>ARN-polimeraza ADN-dependentă</u> care necesită ca substrate cei patru ribonucleozid-5'-trifosfaţi (adenozintrifosfatul=ATP, guanozintrifosfatul=GTP, citidintrifosfatul=CTP şi uridintrifosfatul=UTP), apoi ionii de Mg^{2+} (Mn^{2+}) şi prezenţa unei matriţe, de preferinţă ADN dublu catenar. Reacţia sumară, catalizată de ARN-polimeraza poate fi redată prin ecuaţia 12.2 :



$$n_1ATP + n_2GTP + n_3CTP + n_4UTP \xrightarrow[Mg^{2+}(Mn^{2+})]{ADN} AMP_{n_1}-GMP_{n_2}-CMP_{n_3}-UMP_{n_4} + (n_1+n_2+n_3+n_4)PP_i \quad (12.2)$$

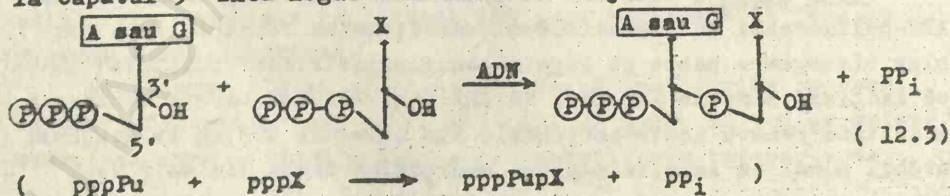
Conform reprezentărilor actuale sinteza ARN cu ajutorul ARN-polimerazei ADN-dependente se desfăşoară în mai multe etape: 1) legarea matriţei; 2) iniţierea transcrierii; 3) elongarea şi 4) terminarea transcrierii.

<u>Prima etapă</u> a ciclului de transcriere cuprinde interacţiunea ARN-polimerazei cu ADN matriceal, condiţionînd formarea unui complex binar, care poate să lege ribonucleozidtrifosfatul (NuTP) şi să iniţieze sinteza lanţului de ARN. Deşi ARN-polimeraza manifestă afinitate pentru toate porţiunile din molecula ADN, ea se ataşează stabil numai la anumite regiuni aparţinînd uneia din cele două catene ale ADN-matriţă. Aceste regiuni constituind semnale de start

pe matriţa de ADN se numesc <u>promotori</u>.Ei reprezintă secvenţa de pînă la 50 nucleotide lungime,localizate imediat înaintea genei sau grupului de gene a cărei informaţie genetică trebuie transcrisă în ARN.ARN-polimerazele reprezintă molecule proteinice mari, unele din ele fiind alcătuite din subunităţi.Astfel ARN-polimeraza din <u>E.coli</u> este un oligomer conţinînd patru tipuri de subunităţi α, β, β' şi σ şi ioni de zinc.Masa moleculară a enzimei este de 495.000 D.Structura cuaternară a holoenzimei poate fi descrisă de formula $[\alpha_2\beta\beta']\sigma$.Se consideră că ARN-polimeraza recunoaşte în mod specific prin subunitatea σ secvenţa nucleotidică a promotorului. Ataşarea ARN-polimerazei la promotor induce despiralizarea parţială a moleculei de ADN şi scindarea legăturiler de hidrogen între bazele azotate complementare din catenele matriţei,cu formarea aşa-numitului <u>complex</u> <u>deschis</u>,capabil să înceapă sinteza ARN.De reţinut că secvenţa promotorului nu este transcrisă în ARN sintetizat.

La eucariote se cunosc trei tipuri principale de ARN-polimeraze.ARN-polimeraza I(A),localizată predominant în nucleol,catalizează sinteza ARNr;ARN-polimeraza II(B),locaţizată în nucleoplasmă,răspunde de sinteza ARN nuclear heterogen care include ARNm;ARN-polimeraza III(C),localizată mai ales în nucleoplasmă, este implicată în sinteza ARNt şi alter ARN micromoleculari.In organismul superior pot să existe cîteva ARN-polimeraze de fiecare tip.ARN-polimerazele eucariotelor au masa moleculară de circa 500.000 D şi sînt alcătuite din 4-12 subunităţi diferite.

<u>Iniţierea</u> sintezei lanţului de ARN sub acţiunea ARN-polimerazei începe cu reacţia ATP sau GTP cu o a doua moleculă de ribonucleozidtrifosfat,conducînd la formarea unui dinucleotid,avînd la capătul 5' încă legat trifosfatul(ecuaţia 12.3).

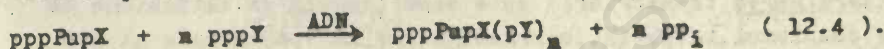


Imediat după ce sinteza catenei de ARN a început,subunitatea σ se desprinde de complexul format cu ARN-polimeraza şi poate să

se atageze la altă moleculă de miez-enzimă. Catena de ARN se alungește sub acțiunea miez-polimerazei (polimerazei minimale: $\alpha_2\beta\beta'$).

Inițierea transcrierii poate fi inhibată în mod specific la procariote de antibioticul rifamicina, iar la eucariote de α-amanitină care reprezintă o otravă puternică conținută în ciupercile din genul Amanita.

Elongarea catenei ARN se realizează prin legarea succesivă a unui nou ribonucleozidmonofosfat la capătul 3'-OH al dinucleotidului (polinucleotidului) precedent (ecuația 12.4).



$$pppPupX + n\ pppY \xrightarrow{ADN} pppPupX(pY)_n + n\ PP_i \qquad (12.4).$$

Formarea punților fosfodiesterice între ribonucleotide are loc numai în direcția 5'→3', adică ARN-polimeraza începe să acționeze de la capătul 3' al catenei de ADN transcrisă. Deci matrița și transcriptul său sînt antiparalele. ARN-polimeraza primește instrucțiunile pentru sinteza ARN de la ADN-matriță. Catena ADN-matriță formează cu catena ARN în creștere un hibrid molecular ADN-ARN temporar, prin intermediul legăturilor de hidrogen între bazele azotate complementare: adenină-uracil, guanină-citozină, timină-adenină, citozină-guanină (fig. 12.14). Prin urmare catena ARN

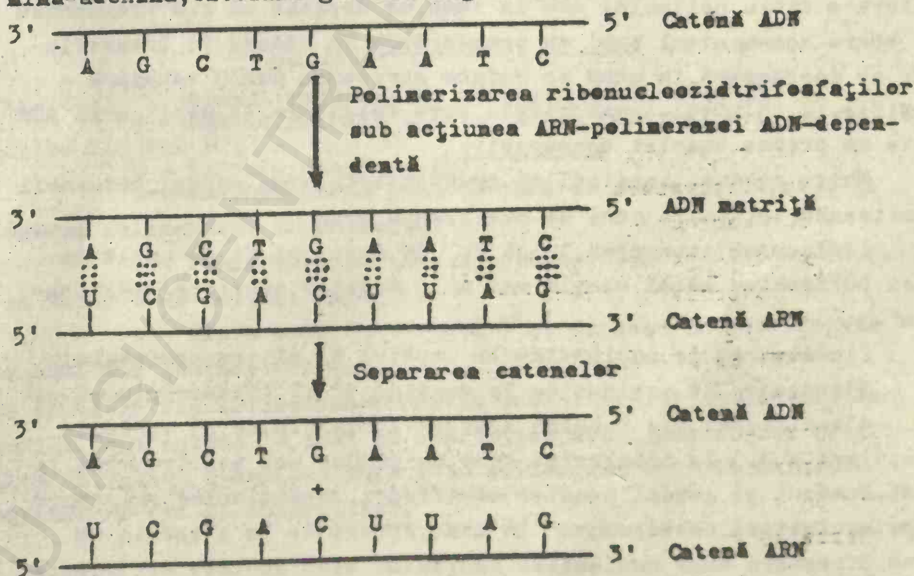


Fig. 12.14. Complementaritatea catenelor ADN matriță și a catenei de ARN în creștere.

ce se sintetizează este complementară catenei de ADN matriţă. La un anumit nivel al genomului numai una din catenele ADN serveşte drept matriţă, cealaltă catenă nefiind transcrisă. Deci, transcrierea este un proces asimetric.

Elongarea catenei ARN este blocată de către antibioticul streptolidigina care inhibă ARN-polimeraza. Actinomicina D inhibă atît ADN-polimerazele cît şi ARN-polimerazele. Antibioticele care blochează procesul de transcriere, acţionează asupra subunităţii β a ARN-polimerazei.

Terminarea transcrierii este condiţionată de întîlnirea de către complexul tripartit, cuprinzînd ADN, ARN-polimeraza şi ARN născînd, a unui semnal de terminare care poate fi reprezentat de un anumit bloc de baze perechi (TTTTT---- / AAAAA----) din molecula ADN matriţă. In consecinţă, are loc eliberarea catenei de ARN sintetizată şi dezorganizarea complexului de transcriere. Unele semnale de terminare sînt recunoscute de însăşi ARN-polimeraza, iar altele cu ajutorul aşa-numitului factor ρ (rho) care este o proteină cu masa moleculară de 200.000 D.

Cum s-a menţionat, sinteza catenei ARN este asociată cu o depliere a dublu helixului ADN în zona ce urmează să fie transcrisă şi apare aşa-numitul ochi de transcriere. Pe măsură ce transcrierea se desfăşoară, în urmă se reface structura dublu catenară a ADN (fig.12.15). Deci transcrierea spre deosebire de replicarea ADN este un proces complet conservativ.

Mulţi produşi imediaţi ai transcrierii sînt supuşi maturării posttranscripţionale care se realizează prin:

1) clivarea catenelor lungi de ARN care pot fi în unele cazuri poligenice, adică conţin mai mult decît o secvenţă codificatoare;

2) adăugarea de nucleotide la capătul 3' al transcriptului;

3) ataşarea de nucleotide la capătul 5' al transcriptului şi

4) modificări ale bazelor azotate pirimidinice şi purinice (metilare etc.) în transcript care se produc cel mai frecvent în ARNt. Numărul şi gradul acestor modificări, condiţionînd existenţa unor nucleotide neobişnuite în ARNt, diferă de la o specie la alta. Structura unor nucleotide conţinînd baze azotate modificate

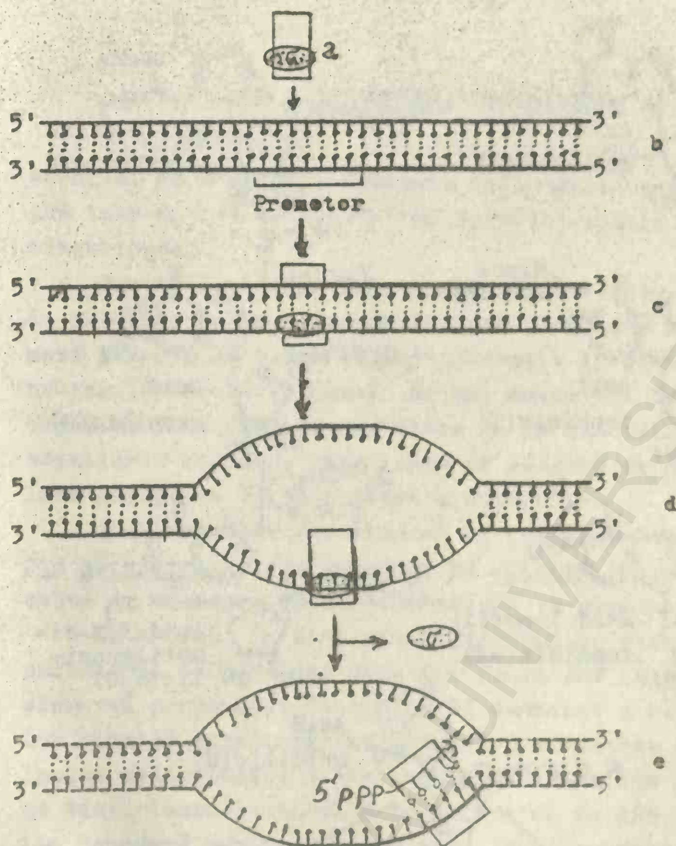


Fig.12.15. Mecanismul probabil de inițiere a sintezei ARN :
a - ARN-polimeraza alcătuită din factorul σ și subunitățile α_2, β și β';
b - Spirala dublă de ADN;
c-- Recunoașterea promotorului de către factorul σ și legarea polimerazei la promotor;
d - Desfacerea porțiunii promotorului din ADN cu formarea celor două lanțuri separate;
e - Eliberarea factorului σ și sinteza ARN codificată de unul din lanțurile ADN.

se arată în fig.12.16. Transformarea nucleotidelor comune din lanțurile în creștere de ARNt în nucleotide neobișnuite este catalizată de enzime specifice care s-au evidențiat atît în celulele bacteriene cît și eucariotice.

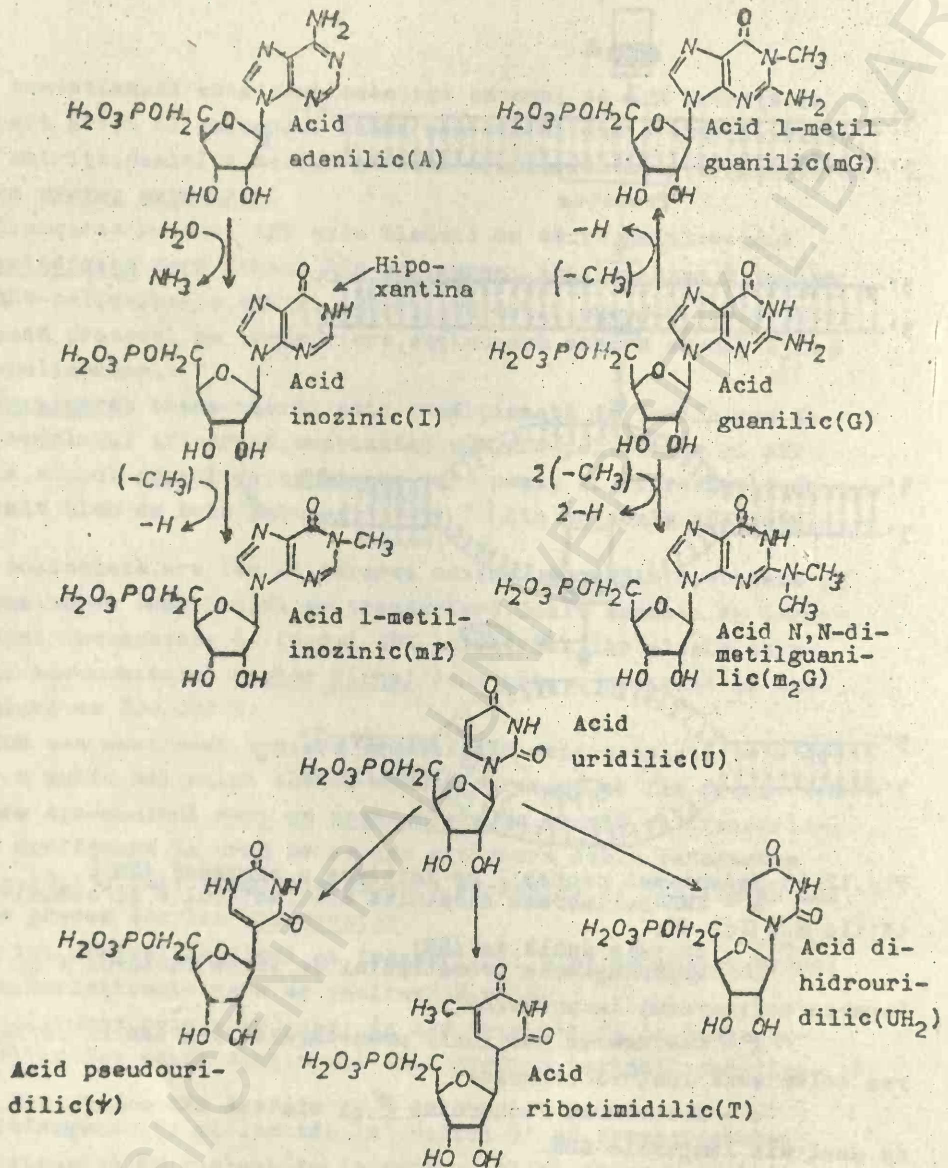


Fig.12.16. Structura unor nucleotide neobişnuite, descoperite în lanţurile polinucleotidice ale tARN şi căile formării lor din nucleotidele obişnuite A, G şi U.

12.2. BIOSINTEZA PROTEINELOR

In organismul viu biosinteza proteinelor reprezintă procesul esenţial care asigură expresia informaţiei genetice codificată în ADN într-un tip de metabolism specific pentru o specie dată de vieţuitoare.

Particularitatea principală a biosintezei proteinice constă în exactitatea ei deosebit de mare. Structura proteinelor, programată genetic, se conservă din generaţie în generaţie, moleculele proteinice sintetizîndu-se de mai multe ori în cadrul aceluiaşi organism fără abateri manifeste de la succesiunea dată a aminoacizilor. O asemenea exactitate se asigură de mecanismele moleculare implicate în biosinteza proteinelor.

In biosinteza proteinelor se realizează aşa-numitul principiu al sintezei complementare pe matriţă, principiu care se întîlneşte de asemenea în replicarea ADN şi biosinteza ARN.

Ca matriţă în biosinteza proteinelor serveşte ARNm, el fiind purtătorul informaţiei genetice de la ADN la ribozomi-sediul biosintezei proteinice. Determinarea genetică a biosintezei proteinelor vizează structura lor primară. Succesiunea aminoacizilor în lanţul polipeptidic sintetizat trebuie să fie conformă cu secvenţa deoxiribonucleotidelor în segmentul de ADN care deţine informaţia necesară pentru sinteza unei anumite proteine. Această relaţie dintre acizii nucleici şi proteine este mediată de un sistem biochimic de codificare—decodificare, cunoscut sub numele de cod genetic.

12.2.1. Codul genetic

Plecînd de la faptul că ADN conţine patru tipuri de baze azotate, iar în compoziţia proteinelor intră 20 de aminoacizi, se poate deduce că secvenţa nucleotidică suficientă pentru codificarea unui aminoacid este o combinare de trei nucleotide adiacente, numită tripletă sau codon. Din patru nucleotide pot să rezulte 4 x 4 x 4 = 64 triplete diferite, oferind posibilitatea codificării tuturor celor 20 aminoacizi principali. Raportul nucleotide : aminoacid = 3 : 1 a fost dovedit, de asemenea, experimental.

Descifrarea codului genetic, adică stabilirea compoziţiei nucleotidice concrete şi a succesiunii tripletelor pentru toţi cei

20 de aminoacizi din compoziţia proteinelor constituie un success remarcabil al biochimiei contemporane.

Intrucît în biosinteza proteinelor nemijlocit se decodifică informaţia de pe ARNm,se obişnuieşte să se reprezinte codonii sub forma tripletelor de ribonucleotide(fig.12.17).Aceeaşi informaţie

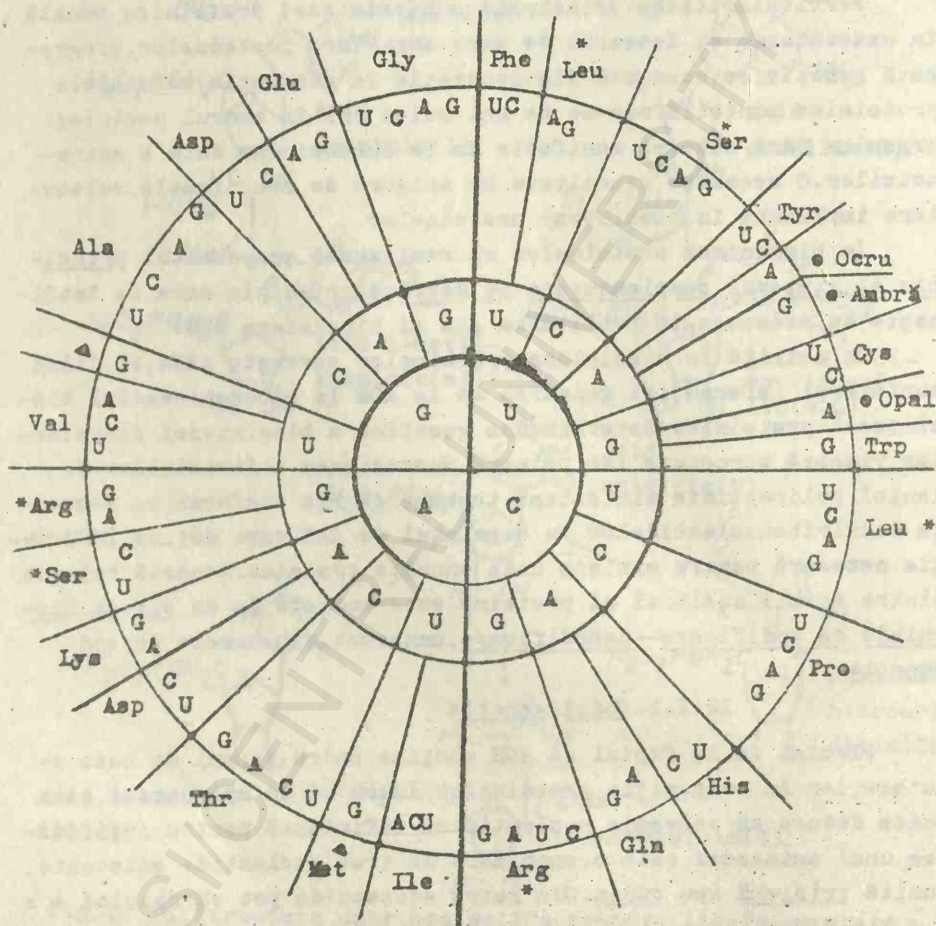


Fig.12.17.Secvenţa ribonucleotidelor în codonii ARNm.Tripletele care codifică diferiţi aminoacizi(ei sînt trecuţi sub formă prescurtată la periferia circumferinţei) se citesc de la centru (capătul 5') spre periferie(capătul 3').In toţi codonii primele

primele două nucleotide sînt strict fixate,iar ultimul poate să se deosebească.O excepţie constituie codonii Trp şi Met.Aminoacizii marcaţi cu steluţă se întîlnesc de două ori;cu puncte şi triunghiuri sînt indicaţi codonii de terminare şi de iniţiere.

sub formă de triplete deoxiribonucleotidice este conţinută în catena de ADN care serveşte ca matriţă în sinteza ARNm.

Din cele 64 de triplete posibile,trei,anume UAA,UAG şi UGA au primit denumirea de codoni terminatori(codoni stop),ei fiind semnalul pentru terminarea translaţiei.Codonii AUG şi GUG se numesc codoni iniţiatori(de iniţiere),ei marcînd începutul sintezei unei catene polipeptidice.

Numeroşi codoni sînt sinonimi,ei codificînd acelaşi aminoacid.De exemplu,serina este specificată de codonii UCU,UCC,UCA, UCG,AGU şi AGC.Această particularitate a codului genetic se numeşte degenerare.In majoritatea cazurilor,codonii sinonimi se deosebesc numai după nucleotidul care ocupă poziţia a treia în tripletă.Primele două nucleotide în tripletă,probabil,au o importanţă mai mare pentru codificarea aminoacidului.Se pare că degenerarea codului genetic este relativă,deoarece codonii sinonimi ai unuia şi aceluiaşi aminoacid nu sînt la fel de eficienţi în biosinteza proteinelor.

Deşi codul genetic este degenerat,el se distinge printr-o ambiguitate redusă.Nici un codon,în afară de GUG nu determină mai mult decît un aminoacid.Codonul GUG poate specifica formilmetionina la începutul translaţiei,dar codifică valina cînd el este în interiorul mesajului.

O caracteristică a codului genetic este universalitatea lui, care ne arată că un anumit codon codifică un acelaşi aminoacid la orice organism viu,indiferent de treapta evolutivă pe care se află.Universalitatea codului genetic constituie unul din argumentele cele mai puternice în favoarea ideei că toate organismele vii au provenit dintr-un precursor unic.

Codul genetic este neacoperit şi fără virgule.Aceasta înseamnă că tripletele succesive,vecine dintr-o secvenţă de nucleotide a unei gene nu se acoperă,nu-şi împrumută nucleotide,nu au nici un nucleotid comun.Codonii reprezintă unităţi de sine stătă-

toare,nesuprapuse.De asemenea,între sfîrşitul unui codon şi începutul codonului următor nu există spaţiu sau nucleotide.Prin urmare codul genetic este fără virgule,lipsind semnele speciale care să marcheze sfîrşitul unui codon şi începutul codonului următor.

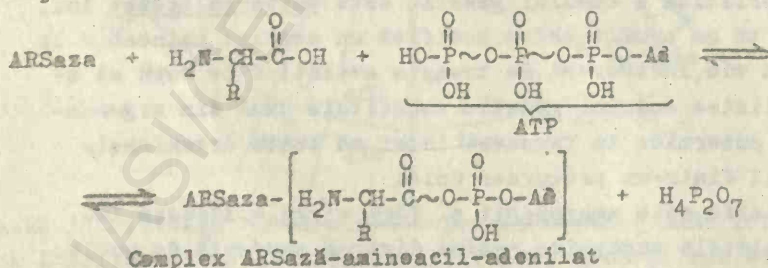
Citirea codului genetic este influenţată de concentraţia ionilor(Mg^{2+}),temperatură,prezenţa solvenţilor organici,antibioticelor(streptomicină) şi alţi factori.

12.2.2.Activarea aminoacizilor şi formarea aminoacil-ARNt

Biosinteza proteinelor este un proces enzimatic complex,cu mai multe etape.

Prima etapă în biosinteza proteinelor este etapa de recunoaştere(recognition),a cărei denumire vine de la faptul că,în cursul acestei etape,aminoacidul recunoaşte prin intermediul unei proteine-enzime,ARNt său specific cu care formează derivatul aminoacil-ARNt.

Formarea derivaţilor aminoacil-ARNt are loc în două stadii. Aminoacidul nu reacţionează cu molecula ARNt,ci este supus mai întîi activării.Procesul de activare a aminoacizilor este catalizat de o enzimă specifică, numită aminoacil-ARNt ligază sau aminoacil-ARNt sintetază(ARSaza),a cărei acţiune cere prezenţa ionilor de Mg^{2+}.Fiecare aminoacid are enzima sa specifică de activare,deci există cel puţin 20 de aminoacil-ARNt sintetaze diferite.Energia necesară pentru procesul de activare a aminoacizilor este furnizată de ATP.In urma interacţiei între ARSază,ATP şi aminoacid se obţine complexul enzimei cu aminoaciladenilatul :

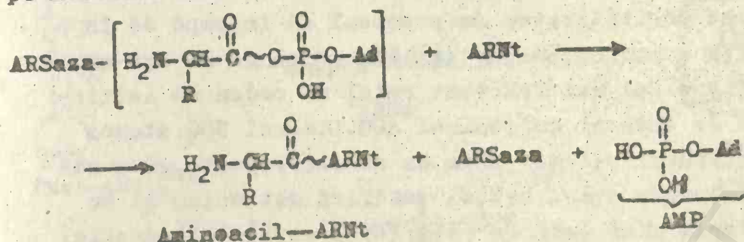


Complex ARSază-aminoacil-adenilat

Aminoaciladenilaţii reprezintă forma activă a aminoacizilor.

In cel de al doilea stadiu,catalizat tot de ARSază,are loc

transferul restului de amineacid activat din complexul menţionat pe molecula ARNt rezultînd astfel derivatul amineacil-ARNt :



Pentru fiecare aminoacid există nu numai o ARSază corespunzătoare,dar şi un ARNt specific.Fixarea aminoacizilor pe moleculele de ARNt se face printr-o legătură esterică între grupa carboxil şi hidroxilul de la carbonul C-2' sau C-3' din riboza adenozinei existente la capătul 3' al catenei poliribonucleotidice (fig. 5.11)

12.2.3.Mecanismul molecular al biosintezei proteinelor în ribozomi

Derivaţii amineacil-ARNt,sintetizaţi în citoplasmă,constituie forma nemijlocită sub care aminoacizii activaţi,sînt transportaţi spre ribozomi,unde are loc biosinteza matricială a proteinelor.

Etapa ribozomală a biosintezei proteinelor se numeşte translaţie,întrucît în această etapă se realizează traducerea secvenţei nucleotidice a ARNm în succesiunea amineacidică a proteinei sintetizate.

Translaţia ARNm în catena polipeptidică cuprinde trei faze: 1)iniţierea translaţiei;2)translaţia propriu-zisă sau polimerizarea amineacizilor în catena polipeptidică,fază numită şi elongaţie;3)terminarea translaţiei.Intrucît,iniţierea,elongarea şi terminarea biosintezei catenei polipeptidice sînt cel mai bine studiate la bacterii,în continuare aceste procese vor fi luate ca bază.In cazurile unde intervin deosebiri între ele şi procesele analoage din celula eucariotă,se vor face menţiunile adecvate.

Iniţierea translaţiei în condiţii fiziologice înseamnă recunoaşterea „punctului(semnalului) de start" în ARNm,asocierea subunităţilor ribozomale şi a unui amineacil-ARNt special,numit aminoacil-ARNt iniţiator,cu acest punct iniţial,rezultînd astfel

complexul ribozomului funcţional activ.

Existenţa unui punct iniţial(punct de citire),strict fixat în translaţie,crează posibilitatea ca procesul să înceapă de la o secvenţă determinată a nucleotidelor în ARNm,adică de la aşa-numiţii codoni de iniţiere.Cel mai frecvent rolul de codon de iniţiere este îndeplinit de codonul metioninei AUG.Codonul GUG,atunci cînd se află la începutul catenei ARNm,de asemenea,poate juca rolul de codon iniţiator.In acest caz,el codifică metionina şi nu valina cum se întîmplă cînd este în interiorul mesajului genetic.

Suportul structural al biosintezei proteinelor îl constituie ribozomii.Pe suprafaţa celor două subunităţi ribozomale există anumite regiuni care asigurînd orientarea sterică optimă a reactanţilor,favorizează desfăşurarea reacţiilor implicate în biosinteza proteinelor.Astfel,fiecare ribozom posedă două regiuni sau situsuri specifice: situsul A(situsul acceptor sau aminoacilic) şi situsul P(situsul donor sau peptidilic)In situsul A se fixează ARNt care aduce următorul aminoacid ce trebuie să se lege la catena polipeptidică în creştere.In situsul P se ataşează ARNt purtînd catena polipeptidică în formare.

In condiţii fiziologice ribozomii neparticipanţi la biosinteza proteinelor se află disociaţi reversibil în subunităţile lor:
70 S $\rightleftharpoons$ 30 S + 50 S (procariote,mitocondrii,cloroplaste),
respectiv 80 S $\rightleftharpoons$ 40 S + 60 S (eucariote).

Iniţierea sintezei proteinice începe cu asocierea ARNm pe suprafaţa subunităţii ribozomale mici,orientată spre subunitatea mare(fig.12.18).Această legare are loc într-un punct situat la circa 10 nucleotide de la capătul 5' al catenei de ARNm,întrucît „citirea" programului ARNm totdeauna se face în direcţia 5'→3'. In limitele unei subunităţi se încadrează numai doi codoni.Primul codon al ARNm la capătul 5' este AUG sau GUG.Formarea şi stabilizarea complexului subunitate mică-ARNm sînt dependente de aşa-numitul factor proteinic de iniţiere IF-3.La complexul binar se ataşează aminoacil-ARNt iniţiator şi GTP,rezultînd un complex ternar sau complexul de iniţiere 30 S.In această interacţiune joacă un rol important factorul de iniţiere IF-2.

La procariote aminoacil-ARNt iniţiator este N-formilmetionil-$ARNt_f^{Met}$($fMet\text{-}ARNt_f^{Met}$).$ARNt_f^{Met}$ se deosebeşte de $ARNt_m^{Met}$ care intro-

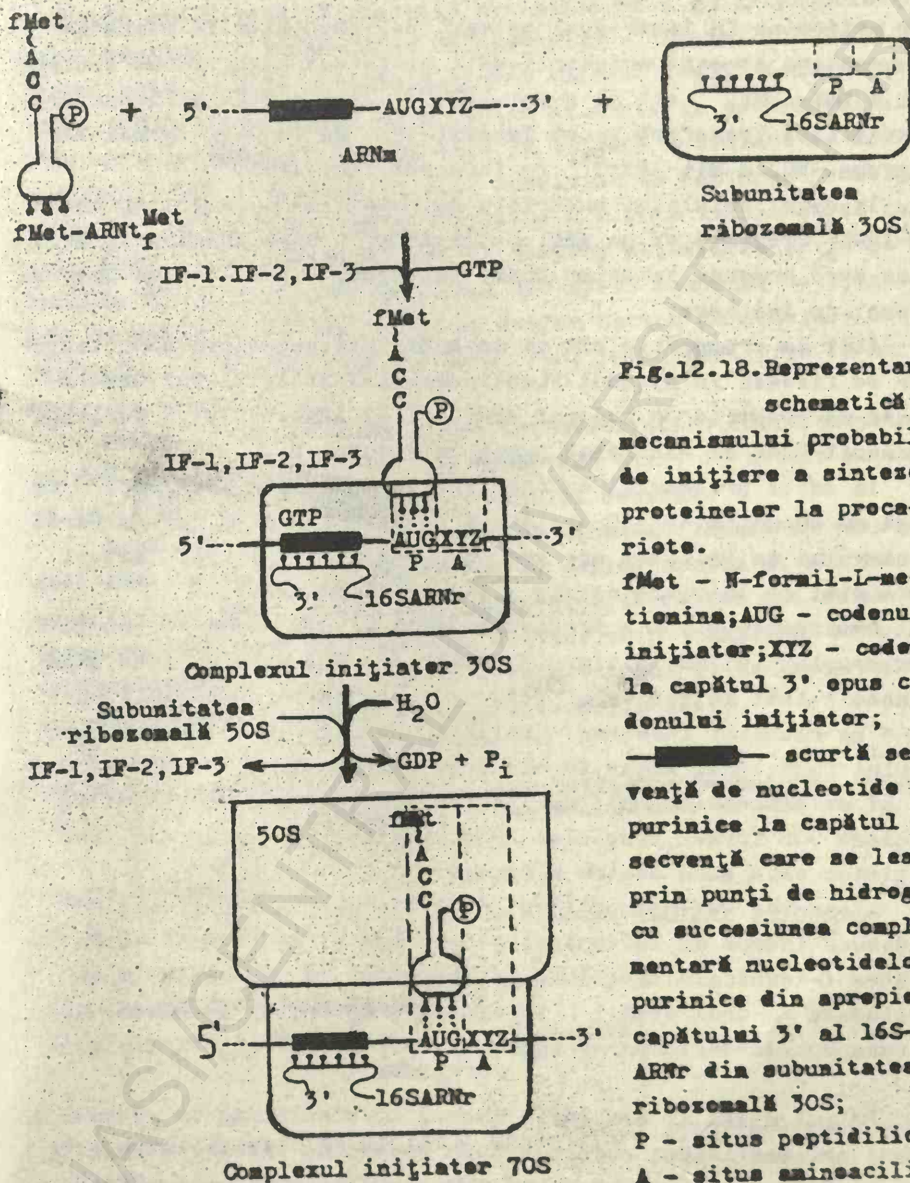


Fig.12.18.Reprezentarea schematică a mecanismului probabil de inițiere a sintezei proteinelor la procariote.
fMet – N-formil-L-metionina;AUG – codonul inițiator;XYZ – codon la capătul 3' opus codonului inițiator;
▬▬ scurtă secvență de nucleotide purinice la capătul 5', secvență care se leagă prin punți de hidrogen cu succesiunea complementară nucleotidelor purinice din apropierea capătului 3' al 16S-ARNr din subunitatea ribozomală 30S;
P – situs peptidilic;
A – situs aminoacilic;
IF-1,IF-2 şi IF-3 – factori proteinici de inițiere.

duce metionina în interiorul catenei polipeptidice. In etapa de recunoaştere aceeaşi aminoacil-ARNt sintetază catalizează sinteza atît a Met-$ARNt_f^{Met}$ cît şi a Met-$ARNt_m^{Met}$. Apoi o N-formiltransferază specifică transferă grupa formil($-C\overset{O}{\lessdot}_H$) de la N-10-formil-THF la grupa $-NH_2$ a Met-$ARNt_f^{Met}$ cu formarea fMet-$ARNt_f^{Met}$.

In cazul celulelor eucariote aminoacil-ARNt iniţiator este Met-$ARNt_i^{Met}$. Există şi un ARNt, notat $ARNt_m^{Met}$ care transportă metionina spre codonul interior. Numai Met-$ARNt_i^{Met}$ poate să se lege cu codonul de iniţiere.

Atît la procariote cît şi la eucariote, aminoacil-ARNt iniţiator se fixează în situsul P, anticodonul ARNt iniţiator împerechindu-se specific cu codonul AUG(GUG) al ARNm. Ceilalţi derivaţi aminoacil-ARNt se ancorează numai în situsul A.

In cazul procesului de iniţiere la eucariote Met-$ARNt_i^{Met}$ se leagă cu subunitatea 40S, înainte de a se ataşa ARNm, iar formarea complexului de iniţiere are loc cu participarea a trei factori proteinici de iniţiere, notaţi eIF-1, eIF-2 şi eIF-3.

Următoarea etapă a procesului de iniţiere cuprinde joncţiunea complexului de iniţiere(alcătuit din subunitatea mică, ARNm, aminoacil-ARNt iniţiator şi GTP) cu subunitatea ribozomală mare, avînd ca rezultat formarea complexului de iniţiere 70S sau ribozomului funcţional activ. Totodată se scindează GTP în GDP şi fosfat şi se eliberează cei trei factori de iniţiere. Complexul de iniţiere 70S format, conţinînd ARNm, ribozomul şi aminoacil-ARNt iniţiator este gata pentru elongare.

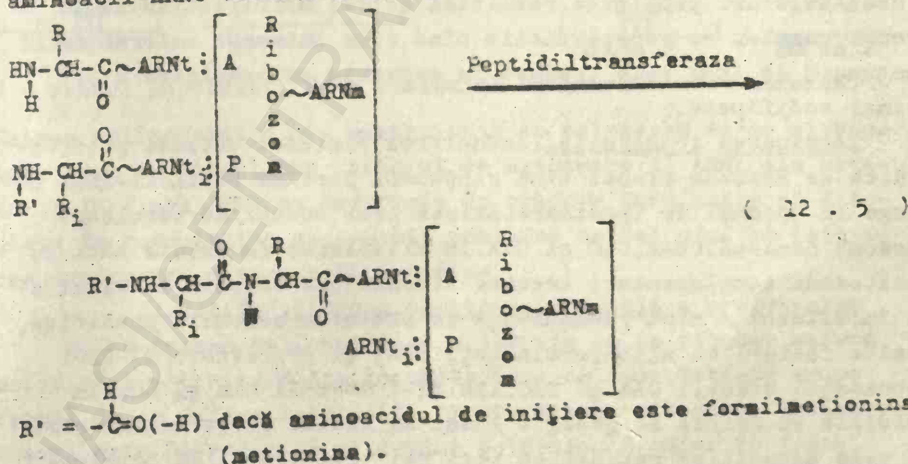
Elongarea catenei polipeptidice. Sinteza unei polipeptide totdeauna începe de la capătul N-terminal şi se termină cu extremitatea C-terminală. Creşterea polipeptidei cu un aminoacid se efectuează în trei stadii : 1)legarea următorului aminoacil-ARNt; 2)transpeptidarea(formarea legăturii peptidice) şi 3)translocaţia.

Primul ciclu al elongării începe cu stabilirea în situsul A a unui aminoacil-ARNt corespunzător codonului liber din acest situs A. Recunoaşterea codonului ARNm se face prin anticodonul ARNt care transportă aminoacidul specificat de acel codon. Datorită legăturilor de hidrogen ce iau naştere între nucleotidele complementare din anticodonul aminoacil-ARNt respectiv şi cele

din codonul liber al ARNm se înfăptuieşte translaţia informaţiei genetice codificată de secvenţa nucleotidică a poliribonucleotidului matriţă în succesiunea aminoacidică a catenei polipeptidice sintetizate. Cu alte cuvinte, alegerea aminoacil-ARNt pentru următorul ciclu al elongării este decisă dinainte de acel codon al ARNm care, în momentul dat, se află în situsul A. Inainte de anexarea aminoacil-ARNt, situsul A se află complexat cu factorul proteinic citosolic de elongare EF-Tu conţinînd GTP. Prin imobilizarea aminoacil-ARNt în situsul menţionat se produce eliberarea EF-Tu şi hidroliza GTP pînă la GDP. Complexul GDP-EF-Tu desprins de pe ribozom interacţionează cu cel de al doilea factor de elongare EF-Ts conducînd la regenerarea GTP-EF-Tu care poate participa la un nou ciclu de elongare.

Unele antibiotice din grupa tetraciclinelor, unele antibiotice aminoglicozidice (streptomicina, neomicina etc.) şi altele acţionează ca inhibitori specifici ai stadiului descris.

După alipirea aminoacil-ARNt pe ribozom alături de aminoacil-ARNt iniţiator se desfăşoară al doilea stadiu al elongării care include <u>sinteza legăturii peptidice</u> între cei doi aminoacizi. Formarea legăturii peptidice se produce prin transferul restului de formilmetionină de pe $ARNt_f^{Met}$ (din situsul P) la grupa amino a aminoacil-ARNt vecin (din situsul A) (ecuaţia 12.5).



Această reacţie este catalizată de enzima peptidiltransferaza.

parte componentă a subunităţii ribozomale mari.

După ce s-a format legătura peptidică, ARNt care a cedat aminoacidul rămîne încă fixat în situsul P, iar peptidil-ARNt format se află încă anexat în situsul A.

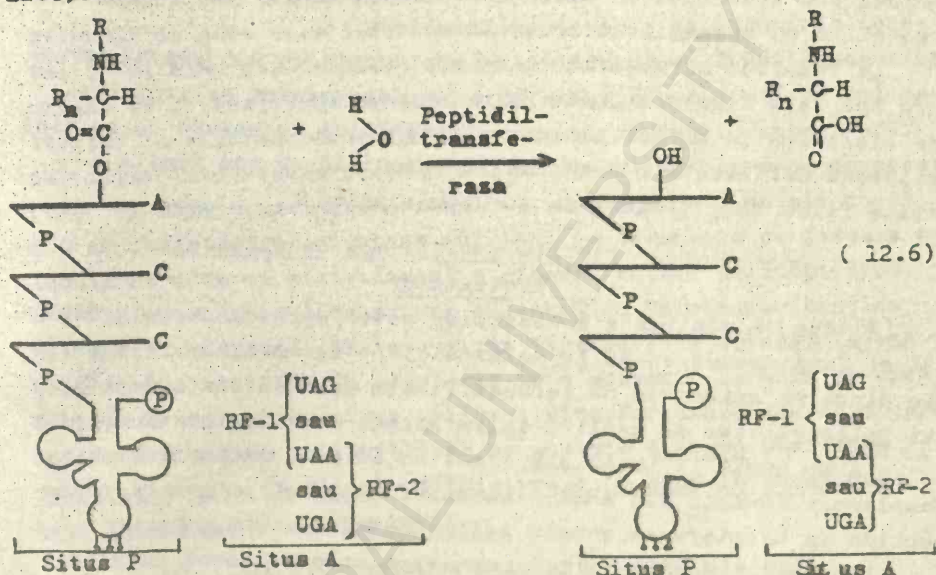
Cel de al treilea stadiu al ciclului de elongare, translocaţia, se produce în prezenţa factorului de elongare denumit EF-G sau translocază. Acest factor, conţinînd GTP, se alipeşte de ribozom şi determină eliberarea $ARNt_f^{Met}$ din situsul P. Factorul EF-G, probabil, favorizează de asemenea transferul peptidil-ARNt din situsul A în situsul P şi în acelaşi timp deplasarea ribozomului pe catena ARNm cu un codon în direcţia 5'→3', încît în situsul A vine codonul următor. Aceste mutări sînt însoţite de îndepărtarea EF-G în citosol şi hidroliza GTP pînă la GDP şi H_3PO_4.

In urma translocaţiei devine liber situsul A şi se desăvîrşeşte primul ciclu de elongare, în care N-formilmetionina se transformă într-o dipeptidă.

Apoi urmează al doilea ciclu de elongare, care începe cu fixarea în situsul A rămas liber a altui ARNt purtînd următorul aminoacid ce trebuie inserat în catena polipeptidică. Repetarea stadiilor descrise pentru primul ciclu conduce la formarea celei de a doua legături peptidice, rezultînd astfel o tripeptidă. Acest proces complex se repetă ciclic pînă cînd întreaga informaţie conţinută de ARNm este tradusă în secvenţa aminoacidică a proteinei codificate.

Terminarea translaţiei. Incheierea sintezei catenei polipeptidice se produce atunci cînd ribozomul purtînd peptidil-ARNt ajunge la codonul de terminare. Există trei codoni de terminare (codoni nonsens): UAA, UAG şi UGA. In citoplasmă nu există ARNt cu anticodoni complementari acestor codoni. Insă codonii de terminare în situsul A sînt recunoscuţi de proteine solubile specifice, numite factori de eliberare, notaţi RF-1 şi RF-2. Factorul RF-1 recunoaşte codonii UAA şi UAG, iar RF-2 codonii UAA şi UGA. In celulele eucariote se găseşte numai un factor de terminare eRF. El este capabil să recunească toţi cei trei codoni de terminare. In unele cazuri garanţia terminării este asigurată de doi codoni terminatori, aşezaţi unul după altul.

Datorită interacţiunii specifice a factorului de eliberare cu codonul de terminare şi cu ribozomul se modifică specificitatea peptidiltransferazei din subunitatea ribozomală mare,enzima catalizînd acum transferul restului peptidil,de la peptidil-ARNt aflat în situsul P,pe molecula de apă.In acest mod are loc hidroliza legăturii esterice dintre restul peptidil şi ARNt(ecuaţia 12.6).



(12.6)

R - restul peptidil ; R_n - radicalul aminoacidului C-terminal

Catena polipeptidică nou sintetizată se detaşează de pe ribozom. Apoi trec în citoplasmă factorul de eliberare şi ARNt din situsul P.In final ARNm se desprinde de ribozom care poate să disocieze în subunităţile componente,rămînînd astfel pînă la iniţierea următoarei catene polipeptidice.

12.2.4.Modificarea posttranslaţională a proteinelor

Multe catene polipeptidice eliberate de pe ribozom suferă modificări ulterioare.Aşa,la procariote se îndepărtează grupa formil de la N-formil-Met.Atît la procariote cît şi la eucariote uneori este hidrolizată metionina N-terminală chiar în timpul sintezei catenei polipeptidice.Aminopeptidazele pot scinda cîteva resturi de aminoacizi de la capătul N-terminal.De asemenea

resturile laterale de aminoacizi în catenele polipeptidice se supun unor modificări specifice. Ca exemple de astfel de modificări menţionăm : formarea punţii disulfidice, hidroxilarea prolinei şi lizinei în colagen, ataşarea radicalilor de glucide la restul de asparagină cu formarea glicoproteinelor, fosforilarea -OH serinei sau treoninei în unele proteine, îmbinarea grupărilor prostetice cu apoenzimele(apoproteinele).

Ca rezultat al modificărilor menţionate se conturează structura spaţială finală a proteinelor, ce determinînd activitatea lor biologică. De altfel, catena polipeptidică, pe măsură ce se sintetizează, dobîndeşte o conformaţie apropiată de cea finală, aceasta fiind condiţionată de structura primară.

12.2.5. Unele particularităţi ale biosintezei proteinelor

Viteza de sinteză a proteinelor este foarte mare : la bacterii se încatenează 20-40 de aminoacizi pe secundă, iar la eucariote circa un aminoacid pe secundă. Viteza mare de sinteză a catenei polipeptidice se explică între altele prin faptul că molecula ARNm poate fi translată simultan de mai mulţi ribozomi. Complecşii formaţi din ARNm, ribozomi funcţional activi şi polipeptide în creştere se numesc <u>poliribozomi</u> sau <u>polizomi</u>.

Deşi sinteza catenei polipeptidice se desfăşoară cu viteză mare, aminoacizii sînt strict legaţi în succesiunea indicată de ARNm, datorită împerecherii codonilor acestuia cu anticodonii de pe ARNt corespunzători. Însă o analiză profundă a problemei necesită unele precizări. Codonul 5'-XYZ-3' din ARNm se cuplează antiparalel cu anticodonul 3'-X'Y'Z'-5' din ARNt. Primele două nucleotide în codon, începînd de la capătul 5' sînt constante, iar ultimul nucleotid(capătul 3') poate fi diferit. Un asemenea grad de libertate explică în mare măsură degenerarea codului genetic. De exemplu, cei patru codoni care codifică treonina, toţi încep cu AC, dar se deosebesc după nucleotidul din poziţia 3'(U, C, A, G). Acest aspect al degenerării se numeşte <u>ipoteza concordanţei neechivalente</u>(„Wobble hypothesis"). Anticodonii unor ARNt, cum s-a menţionat, adesea conţin nucleotide modificate, ca de exemplu, acidul inozinic(IMP sau I). Interesant de subliniat că nucleoti-

dele modificate se găsesc la capătul 5' al anticodonului,deci corespund poziţiei neechivalente în codon.In consecinţă o anumită moleculă de ARNt poate recunoaşte unul,doi sau trei codoni diferiţi în care primele două nucleotide sînt identice.

Numărul de catene polipeptidice care se sintetizează pe o moleculă de ARNm este diferite la procariote şi eucariote. Capătul 5' al ARNm din celulele eucariote începe cu 7-metilguanozina urmată de trifosfat.Se presupune că acest adaos joacă un rol hotărîtor în citirea punctului de start al sintezei catenei polipeptidice: întotdeauna codonul AUG aflat cel mai aproape de acest „cap" al ARNm constituie codonul de iniţiere.Nici un alt codon AUG nu poate îndeplini acest rol.Deci la eucariote pe fiecare moleculă de ARNm se sintetizează o singură catenă polipeptidică.

La procariote ARNm nu are adaosuri la capete,dar conţine mai mulţi codoni de iniţiere şi de terminare pe aceeaşi catenă poliribonucleotidică.In acest caz pe o moleculă de ARNm se sintetizează mai multe catene polipeptidice.Porţiunea din ARNm care codifică o catenă polipeptidică se numeşte cistron.Deci ARNm la procariote este de obicei policistronic,pe cînd la eucariote este întotdeauna monocistronic.

12.2.6.Reglarea celulară a biosintezei proteinelor

Celula vie are capacitatea să-şi regleze sinteza proteinelor în raport cu condiţiile variabile de existenţă.

Proteinele care se sintetizează cu aceeaşi viteză şi în cantităţi constante,indiferent de modificările de mediu,se numesc proteine constitutive.

Alte proteine sînt sintetizate cu viteze schimbătoare ca răspuns la diferite condiţii de viaţă.Sinteza acestor proteine (inclusiv a enzimelor) se reglează cu ajutorul mecanismelor de inducţie şi represie.

Prin inducţie se înţelege declanşarea sau intensificarea sintezei unei enzime sau a unui grup de enzime,participante la aceeaşi secvenţă de reacţii,ca rezultat al pătrunderii în celulă a unei substanţe determinate.Enzimele a căror sinteză se reglează pe calea inducţiei au primit denumirea de enzime inducti-

bile.Substanţele care stimulează viteza de sinteză a enzimelor se numesc inductori.Inductorul este de obicei substratul enzimei date sau o combinaţie structural apropiată acestuia.Un exemplu de inducţie enzimatică îl constituie reglarea sintezei enzimelor de catabolizare a lactozei la Escherichia coli.Dacă celulele de E. coli sînt crescute pe mediu cu glucoză,atunci metabolizarea ei se realizează de enzimele constitutive.Insă prin adaăugarea în mediu a lactozei ca unic substrat de carbon şi energie,se induce sinteza a trei enzime,una din ele fiind β-galactozidaza care scindează lactoza în β-D-galactoză şi α-D-glucoză.Deci lactoza este inductorul β-galactozidazei.Pe calea inducţiei se reglează sinteza enzimelor catabolice care facilitează pătrunderea substratelor în celulă şi integrarea produşilor lor de scindare în metabolismul intermediar.

Termenul de represie defineşte fenomenul de întrerupere a sintezei unei anumite enzime sau a unui grup de enzime catalizînd o succesiune dată de reacţii.Acestea sînt enzimele represibile. Represia se realizează prin intermediul unor substanţe micromoleculare,prezente în celulă,în concentraţii determinate.Astfel,acumularea în celulă a produsului final al unei sau altei căi anabolice determină scăderea vitezei de sinteză a tuturor enzimelor implicate în formarea lui.Represia este specifică reacţiilor de biosinteză.De exemplu,prezenţa argininei în celulele de E.coli produce întreruperea sintezei enzimelor care catalizează biosinteza acestui aminoacid.

Reglarea biosintezei enzimelor pe calea inducţiei şi represiei afectează transcrierea,deci sinteza matricială a ARNm pe ADN cromozomial în care este cuprinsă informaţia genetică pentru codificarea unor proteine date.

Mecanismele moleculare prin care se explică fenomenele de inducţie şi represie a biosintezei proteinelor au fost fundamentate de F.Jacob şi J.Monod,laureaţi ai premiului Nobel în 1965.

Conform ipotezei elaborată de aceşti autori,la baza procesului de reglare a biosintezei proteinelor la procariote se află operonul.Acesta cuprinde o serie de gene structurale care codifică prin intermediul ARNm sinteza proteinelor corespunzătoare.In imediata vecinătate cu grupul acestor gene se găseşte aşa-numita

genă operatoare care controlează punerea în funcţiune şi decuplarea genelor structurale respective, determinînd astfel nivelul activităţii lor, viteza folosirii lor pentru sinteza proteinelor. Probabil fiecare grup de gene structurale care codifică sinteza unor proteine cu funcţii conexe au o genă operatoare proprie. Gena operatoare împreună cu genele structurale alcătuiesc un operon. Gena operatoare se mărgineşte cu o genă numită promotor capabilă să recunoască ARN-polimeraza şi să declanşeze transcrierea genelor structurale. Funcţionalitatea promotorului este dependentă de gena operatoare şi de interacţiunea ei cu diferite substanţe. Funcţia genei operatoare se află sub controlul altei gene speciale, numită genă reglatoare. Această genă nu se găseşte alături cu operonul asupra căruia acţionează. Gena reglatoare poate să fie localizată în altă regiune a cromozomului, la o distanţă oarecare de operon, întrucît ea îşi exercită efectul prin intermediul unei proteine, cu numele de represor. Toţi represorii se leagă cu gena operatoare şi blochează biosinteza ARNm, prin urmare şi biosinteza proteinelor corespunzătoare. Capacitatea de a se lega cu gena operatoare depinde de conformaţia represorului care poate fi activă sau inactivă. Numai în forma activă represorul este capabil să interacţioneze cu gena operatoare şi să întrerupă sinteza ARNm şi a proteinelor respective. Inactivarea represorului este produsă de inductori, iar conversia lui din starea inactivă în starea activă de substanţele care represează biosinteza proteinelor.

Mecanismul inducţiei biosintezei enzimelor poate fi explicat în modul următor: represorul, sintetizat pe ARNm care reprezintă copia genei reglatoare, se leagă de gena operatoare. In consecinţă este blocat accesul ARN-polimerazei la promotor şi nu se poate realiza transcrierea genelor structurale. In această situaţie nu se sintetizează ARNm şi nici enzimele codificate de genele structurale ale operonului respectiv (fig.12.19). Cînd în celulă apare inductorul, el se combină cu represorul şi îi modifică conformaţia, inactivîndu-l. Represorul inactiv îşi pierde afinitatea pentru gena operatoare. Ultima, eliberîndu-se de sub blocajul represorului, cuplează transcrierea genelor structurale pe care le controlează, permiţînd astfel biosinteza ARNm corespunzător şi biosinteza en-

zimelor inductibile codificate de aceste gene.

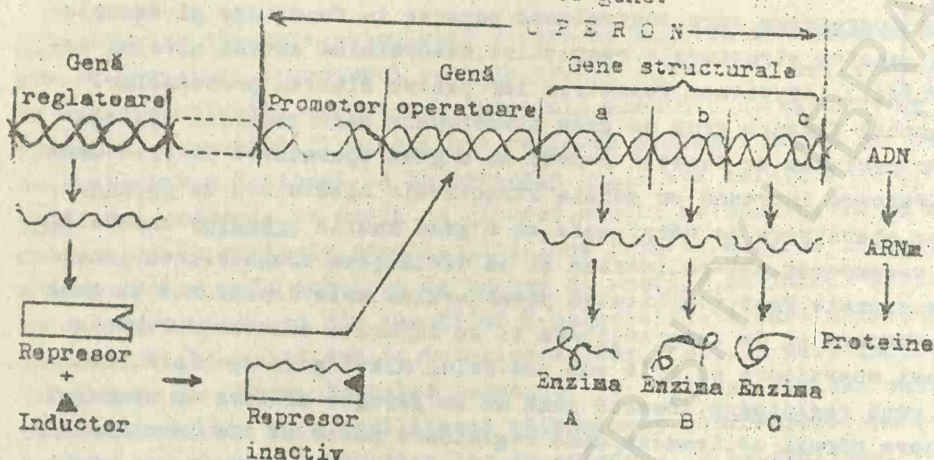


Fig.12.19.Schema mecanismului de inducţie a sintezei enzimelor.

In cazul enzimelor a căror sinteză se reglează pe calea represiei se postulează o afinitate spontană redusă a represorului pentru gena operatoare.Represorul se activează în urma combinării lui cu un metabolit,denumit <u>corepresor</u> care poate să fie produsul final al unei secvenţe date de reacţii.Represorul activ se poate uni cu gena operatoare,blocînd-o şi inhibînd legarea ARN-polimerazei de promotor.In această situaţie ARNm nu poate să fie sintetizat,iar decuplarea transcrierii genelor structurale atrage după sine întreruperea procesului de translaţie.

Inducţia şi represia sintezei proteinelor au loc atît la procariote cît şi la eucariote.Insă complexitatea structurală a celulelor eucariote a favorizat,probabil,apariţia unor mecanisme şi căi suplimentare de reglare a biosintezei proteinelor.

Un rol important în reglarea biosintezei proteinelor la organismele superioare posedă substanţele biologic active(hormoni, neuromediatori,amine biogene etc.).Acţiunea lor poate să se manifeste asupra transcrierii,formării aminoacil-ARNt şi nemijlocit asupra procesului de translaţie.

Cu toată importanţa fundamentală şi aplicativă a problemei, mecanismele moleculare ale reglării biosintezei proteinelor la eucariote sînt studiate insuficient.

12.3. METABOLISMUL CROMOPROTEINELOR

Cromoproteinele sînt heteroproteine (proteine complexe) alcătuite dintr-o proteină simplă şi o grupare prostetică colorată care poate fi un derivat izoaloxazinic, porfirinic etc. Foarte importante şi răspîndite în natură sînt cromoproteinele care au ca grupare prostetică diferite fier-porfirine. Din această clasă de cromoproteine fac parte hemoglobinele, mioglobinele, cloroplastina şi unele oxidoreductaze (catalaza, peroxidaza, citocromii).

12.3.1. STRUCTURA HEMOGLOBINELOR

Hemoglobinele conţin ca grupare prostetică hemul sau protohemul care este complexul chelatic al protoporfirinei IX cu fierul bivalent. Protoporfirina IX se leagă cu atomul de fier prin intermediul atomilor de azot ai celor patru inele pirolice. Structura hemului este redată în fig.12.20.

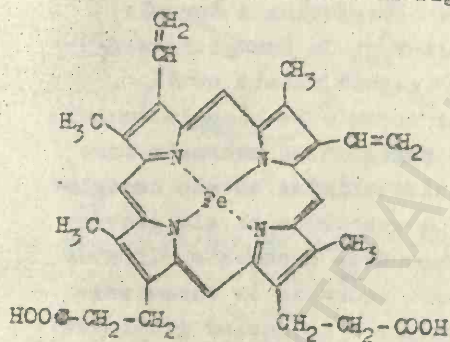


Fig.12.20. Structura hemului

Componentul proteic al hemoglobinelor se numeşte globină. In timp ce protohemul prezintă aceeaşi structură la toate speciile de animale, globinele sînt diferite. Ele conferă hemoglobinelor specificitate de specie.

Masa moleculară a hemoglobinei este de 60.000 - 70.000 D.

Molecula de hemoglobină din sîngele omului şi al unor mamifere este un tetramer constituit din patru catene polipeptidice, fiecare catenă complexînd cîte o moleculă de protohem. Atît la om, cît şi la animale există mai multe tipuri de hemoglobine care se deosebesc prin caracteristicile fizice, chimice şi imunologice.

In organismul adultului normal predomină cantitativ aşa-numita hemoglobină normală A. Sîngele embrionului şi copilului nou născut conţine 80% hemoglobină F (hemoglobină fetală). In eritrocitele omului matur s-a mai găsit încă hemoglobina A_2 care reprezintă în medie 2,5%. Hemoglobina F se deosebeşte de hemoglobina

normală A după proprietăţi şi compoziţia în aminoacizi. Din hemoglobina A lipseşte izoleucina, în timp ce hemoglobina F conţine acest aminoacid în proporţie de 1,4%, ceea ce indică, probabil, originea foarte veche a ultimei hemoglobine, deoarece în hemoglobinele păsărilor intră aminoacidul menţionat.

In compoziţia moleculei de hemoglobină intră patru catene polipeptidice de globină, fiecare dintre ele fiind legată cu o moleculă de protohem. Hemoglobina A este alcătuită din două <u>catene α</u> şi două <u>catene β</u>. O catenă α se compune din 141 de aminoacizi, iar o catenă β din 146 de aminoacizi. Studiul structurii primare a globinei din hemoglobina F umană a arătat că succesiunea aminoacizilor în catenele α este identică cu cea a catenelor corespunzătoare din hemoglobina A. Celelalte două catene din molecula hemoglobinei F se deosebesc esenţial de catenele β ale hemoglobinei A şi au căpătat denumirea de <u>catene</u> γ. In conformitate cu cele de mai sus se poate folosi pentru hemoglobina A formula $\alpha_2\beta_2$, iar pentru hemoglobina F - formula $\alpha_2\gamma_2$. In hemoglobina A_2 catenele β sînt înlocuite cu alte două catene, notate cu δ.

In afară de cele trei hemoglobine normale în sîngele omului au fost puse în evidenţă şi tipuri de hemoglobine anormale care se diferenţiază după proprietăţile fizico-chimice. Aceste hemoglobine sînt, cu cîteva excepţii, rezultatul unor mutaţii ale genelor codificatoare. Numărul hemoglobinelor anormale depăşeşte cifra de 50. In marea lor majoritate, hemoglobinele anormale se caracterizează prin modificări în structura primară a catenelor globinice cauzate de substituirea unor aminoacizi prin alţii.

Structurile secundară, terţiară şi cuaternară ale moleculei de hemoglobină au fost studiate de biochimistul englez M.F. Perutz, cu ajutorul difracţiei în raze X. Fiecare din cele patru catene polipeptidice ale hemoglobinei posedă o structură terţiară foarte asemănătoare cu conformaţia mioglobinei care are molecula constituită numai dintr-o catenă polipeptidică şi un singur hem(*fig*.4.7). Mioglobina joacă un rol important în aprovizionarea cu oxigen a ţesutului muscular, mai ales la animalele acvatice, unde leagă circa 40% din oxigenul ţesuturilor. Structura terţiară a moleculei de mioglobină şi a fiecăruia din cei patru monomeri ai hemoglobinei(*fig*.12.21) rezultă prin înfăşurarea catenei

polipeptidice într-un ghem cu formă nesistematizată.Acest ghem este format din fragmente liniare,reprezentînd α-helixuri(structura secundară),care alternează cu regiuni curbate,arcuite,nespiralate.Molecula hemului este localizată într-unul din arcurile catenei,la suprafaţa acesteia.Fierul din hem posedă 6 valenţe coordinative,din care patru revin atomilor de azot ai inelelor pirolice. O legătură coordinativă cu fierul o formează apa care intră în constituţia moleculei de hemoglobină şi mioglobină.Ca al şaselea ligand serveşte o grupă funcţională din globină: azotul imidazolic al histidinei în cazul mioglobinei şi o grupă slab acidă(carboxilică sau tiolică) în cazul hemoglobinei.

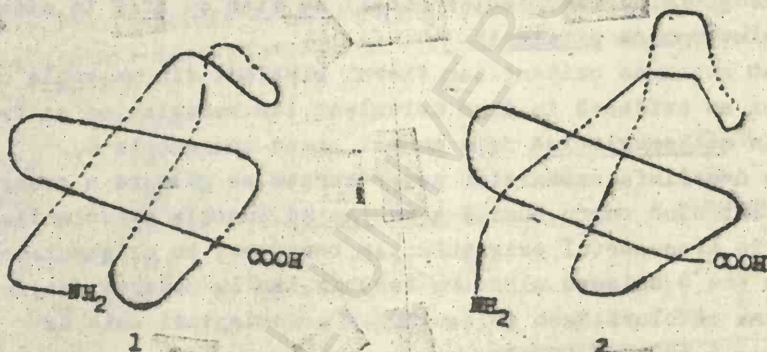


Fig.12.21.Schema structurii terţiare a catenelor globinice din molecula de hemoglobină.
1 - catena α ; 2 - catena β . Linia continuă indică porţiunile α-spiralate din catena polipeptidică.

In ce priveşte structura cuaternară,s-a constatat că cei patru monomeri din molecula hemoglobinei sînt dispuşi astfel,încît fiecare catenă a perechii identice este rotită faţă de cea de a doua catenă cu 180°.Ca rezultat apare o moleculă cu formă aproape globulară avînd în centru un orificiu.Această structură cuaternară complexă se corelează cu funcţia biologică a hemoglobinei de a lega O_2 şi a-l transporta de la plămîni spre ţesuturile din organismul animal.La fixarea şi cedarea O_2 de către hemoglobină,conformaţia ei suferă modificări remarcabile : legarea oxigenului este însoţită de apropierea catenelor β ,iar cedarea

oxigenului conduce la creşterea corespunzătoare a volumului moleculei. Asemenea fenomen este caracteristic numai pentru hemoglobină. Mioglobina care nu are structură cuaternară, molecula ei fiind alcătuită numai dintr-o catenă polipeptidică unită cu hemul, nu manifestă efectul descris.

Complexul hemoglobinei cu oxigenul se numeşte oxihemoglobină. Fiecare atom de fier din molecula hemoglobinei poate să se unească cu o moleculă de oxigen. Această reacţie este reversibilă, oxihemoglobina disociind uşor în hemoglobină şi O_2. Atît în hemoglobină cît şi în oxihemoglobină atomii de fier se află în aceeaşi stare electronică bivalentă.

Sub acţiunea oxidanţilor, fierul bivalent din molecula hemoglobinei se oxidează în fier trivalent, iar hemoglobina se transformă în methemoglobină care nu mai poate transporta O_2.

In hemolimfa animalelor nevertebrate se găseşte o cromoproteină conţinînd cupru, numită hemocianină. Funcţia hemocianinei constă în transportul oxigenului. In complexul cu oxigenul, hemocianina are o culoare albastru deschis, iar la cedarea oxigenului ea devine incoloră. Masa moleculară a hemocianinei este de 350.000 - 6.500.000 D.

12.3.2. BIOSINTEZA HEMOGLOBINEI

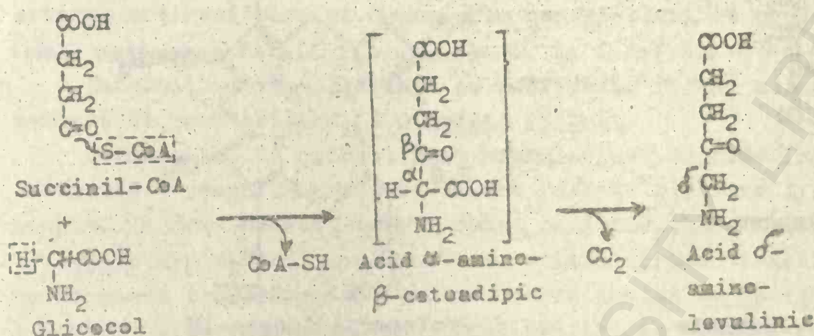
Biosinteza hemoglobinei sau hemoglobinogeneza cuprinde mai multe etape.

12.3.2.1. Biosinteza nucleului porfirinic

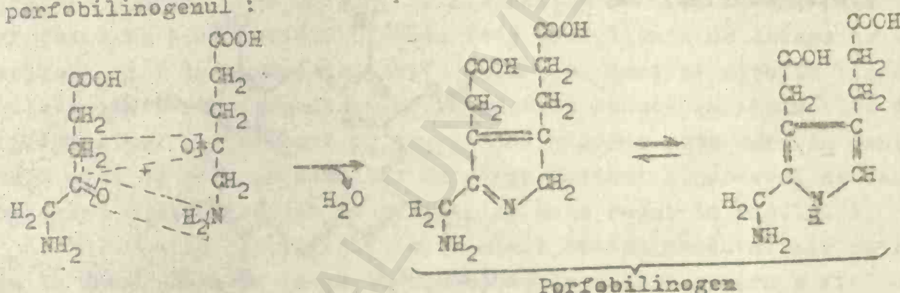
Experienţele cu substanţe conţinînd izotopi radioactivi au relevat că glicocolul şi succinil-CoA servesc drept precursori în sinteza nucleului porfirinic (D. Shemin et al., 1952, 1953; L. Lascelles, 1957). Deci, biosinteza porfirinelor se corelează cu metabolismul aminoacizilor şi ciclul acizilor tricarboxilici.

In construcţia fiecărui inel pirolic din scheletul porfirinic participă doi moli de succinat şi doi moli de glicocol. Sinteza inelului pirolic debutează cu reacţia de condensare între succinil-CoA şi glicocol, catalizată de enzima δ-aminolevulinat-sintetaza piridoxalfosfat dependentă. Se presupune că în această reacţie apare ca intermediar acidul α-amino-β-cetoadipic care prin

decarboxilare formează acidul δ-aminolevulinic :



Din două molecule de acid δ-aminolevulinic, sub acţiunea aminolevulinat-dehidratazei (porfobilinogen-sintazei), rezultă porfobilinogenul :

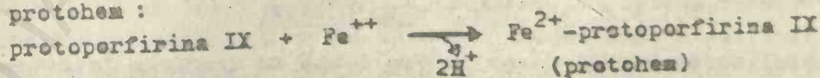


Porfobilinogenul constituie precursorul direct al porfirinelor. Din patru molecule de porfobilinogen, pe calea unor reacţii cu un mecanism complex, se sintetizează protoporfirinogenul IX care se transformă în protoporfirina IX (fig.12.22).

Protoporfirina IX intră în structura hemului, clorofilei, catalazei, peroxidazei şi citocromilor.

12.3.2.2. Formarea protohemului

Enzima fierochelataza, care a fost izolată atît din mitocondriile animalelor şi plantelor cît şi din plastide, catalizează încorporarea fierului în protoporfirina IX care se transformă în protohem :



$$\text{protoporfirina IX} + Fe^{++} \xrightarrow[2H^+]{} Fe^{2+}\text{-protoporfirina IX (protohem)}$$

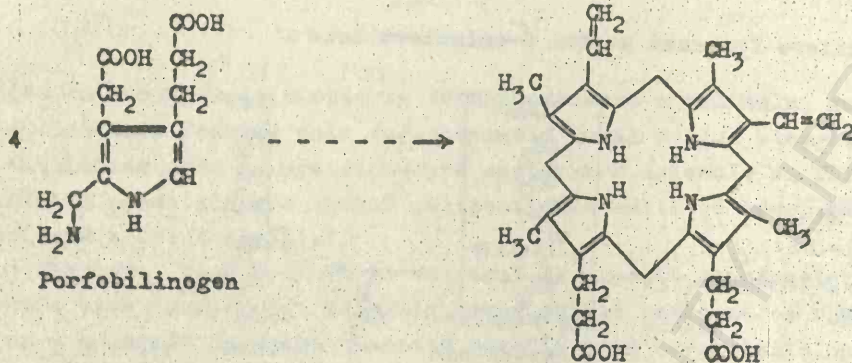
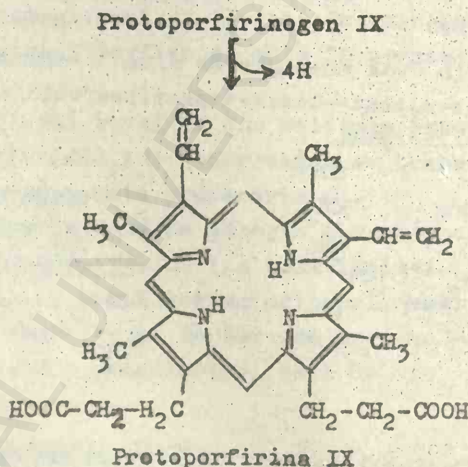


Fig.12.22.Unele etape ale biosintezei protop rfirinei IX.



12.3.2.3.Biosinteza globinei

Biosinteza globinei are loc în ribozomii eritroblaştilor (globule roşii cu nucleu,în stare de formare),pe calea descrisă de sinteză proteinică.Acidul tetrahidrofolic şi vitamina B_{12} stimulează formarea globinei.

12.3.2.4.Complexarea hemului cu globina

In ultima etapă a procesului de hemoglobinogeneză,hemul se complexează cu globina şi astfel ia naştere molecula de hemoglobină.Biosinteza hemoglobinei se desfăşoară în măduva oaselor.

12.3.3.CATABOLISMUL HEMOGLOBINEI

Catabolizarea hemoglobinei începe odată cu trecerea intervalului de timp corespunzător vieţii eritrocitelor(120 zile).Fago-

citarea eritrocitelor şi degradarea hemoglobinei se produc în sistemul reticuloendotelial, preponderent în ficat, splină etc.

Catabolismul hemoglobinei se realizează în mai multe etape şi conduce la compuşii numiţi pigmenţi biliari.

Prima etapă în catabolismul hemoglobinei cuprinde ruperea oxidativă a grupei α-metinice dintre inelele pirolice A şi B ale hemului. In urma acestei transformări oxidative, catalizată de hemoxigenază, enzimă NADP dependentă, se elimină grupa α-metinică şi se formează o substanţă de culoare verde, numită verdoglobină sau coleglobină, care pe lîngă scheletul porfirinic deschis conţine încă globina şi Fe^{3+}. Apoi, verdoglobina pierde atomul de fier şi globina. Atomul de fier este legat de o proteină transportoare, numită transferină(Tf) care îl pune la dispoziţia măduvei osoase pentru procesul de hematopoieză. Globina este hidrolizată de catepsinele splinei pînă la aminoacizi. Astfel, apare un derivat pirolic liniar, colorat în verde, denumit biliverdină. Prin reducerea enzimatică a biliverdinei se formează bilirubina, un pigment roşu, care în cantităţi mici se găseşte constant în sînge. Schematic procesul de catabolizare a hemoglobinei în bilirubină este redat în fig.12.23.

Bilirubina sintetizată în celulele reticuloendoteliale pătrunde în sînge, unde se leagă cu albumina plasmatică pentru a fi transportată la ficat.

Bilirubina, fie că este sau nu fixată pe albumina plasmatică, dacă are grupele carboxil neesterificate, poartă numele de bilirubină „liberă" sau „indirectă".

In ficat, bilirubina indirectă se eliberează din complexul cu albumina şi reacţionează cu acidul UDP-glucuronic. In urma acestei reacţii catalizate de UDP-glucuronozil-transferază rezultă monoglucuronid-bilirubina(20%) şi diglucuronid-bilirubina(80%). Această formă conjugată se numeşte bilirubină „directă". Din ficat, bilirubina solubilizată prin conjugare, împreună cu bilirubina liberă se acumulează în vezica biliară, de unde este secretată odată cu sucul biliar în tubul digestiv. In intestin, bilirubina esterificată este hidrolizată. La nivelul mucoasei intestinale o cantitate minimă de bilirubină se poate absorbi şi pe calea venei porte pătrunde iarăşi în ficat, fiind excretată din nou prin bilă. Cantita-

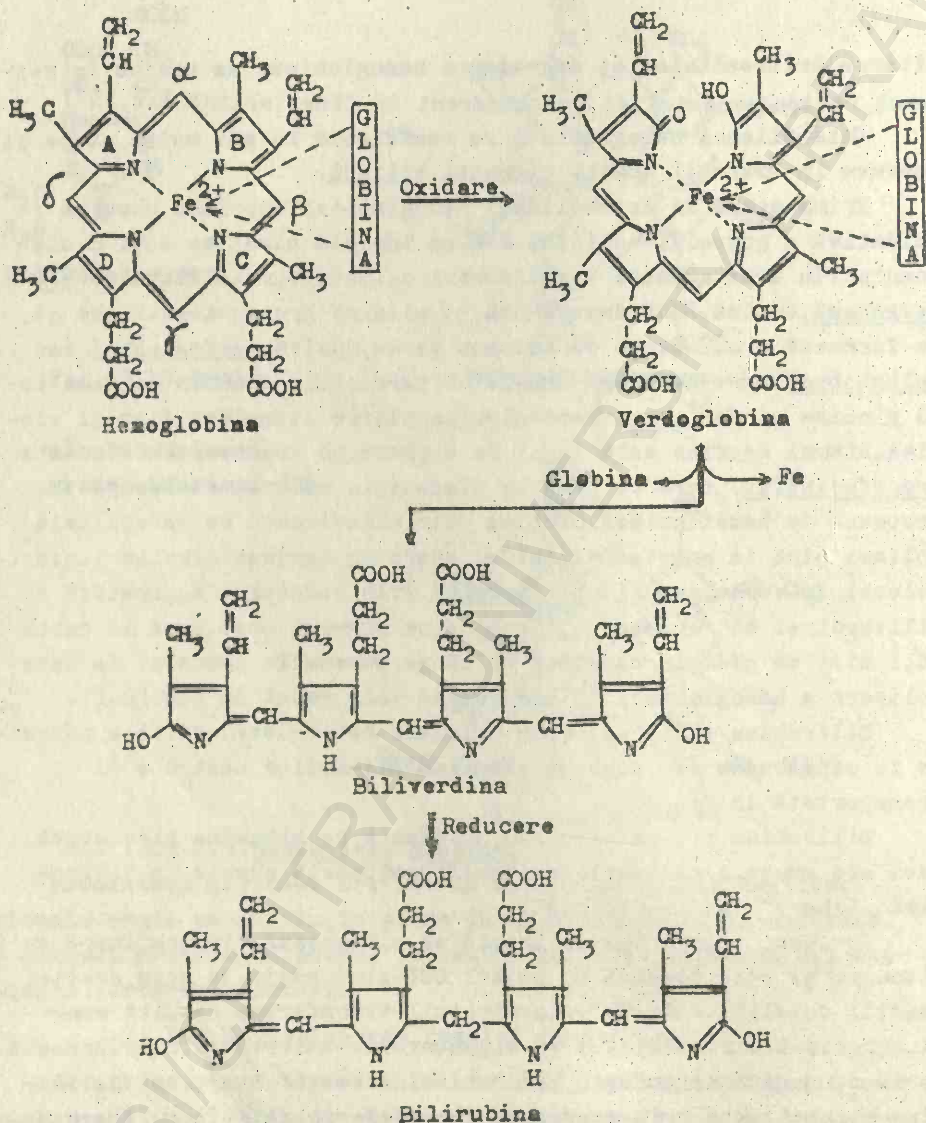


Fig.12.23. Catabolizarea hemoglobinei în bilirubină.

tea majoră de bilirubină este transformată de microorganismele intestinale în diferiți produși care parțial sînt absorbiți și retransfromați în bilirubină, parțial sînt eliminați pe cale renală și în fecale.

13. VITAMINE

13.1. INTRODUCERE

In afară de glucide, lipide, aminoacizi, proteine, acizi nucleici există şi alţi factori absolut necesari pentru asigurarea unei activităţi fiziologice normale a organismului viu. Intre aceştia un loc deosebit ocupă vitaminele.

Vitaminele sînt substanţe organice micromoleculare cu structură chimică diferită, care exercită o influenţă esenţială asupra desfăşurării proceselor biochimice în organismul viu. Multe vieţuitoare, de exemplu microorganismele şi plantele pot sintetiza vitaminele. Animalele, cu puţine excepţii, nu au capacitatea de a realiza sinteza tuturor vitaminelor şi le primesc în hrană.

Vitaminele cunoscute în prezent se împart în trei grupe :

1) vitamine liposolubile ;

2) vitamine hidrosolubile şi

3) substanţe asemănătoare vitaminelor.

Vitaminele îndeplinesc în organismul viu cele mai diverse funcţii, determinînd creşterea şi dezvoltarea normală a acestuia. In celula vie vitaminele se întîlnesc libere, fosforilate şi legate cu proteinele. Numeroase vitamine se folosesc pentru biosinteza coenzimelor şi grupărilor prostetice ce intră în structura enzimelor bicomponente. Vitaminele, posedînd o activitate biologică foarte ridicată, participă la reglarea diferitelor procese metabolice în organismele vii.

Lipsa unei sau altei vitamine din hrana omului şi a animalelor provoacă tulburări ale metabolismului substanţelor, care se manifestă prin boli specifice numite avitaminoze. Dacă hrana conţine o vitamină în cantitate insuficientă pentru a acoperi cerinţa organismului, maladia este mai puţin expresivă şi poartă numele de hipovitaminoză. Introducerea în organism a unui exces de vitamine, de asemenea, poate cauza boli denumite hipervitaminoze.

Apariţia avitaminozelor şi hipovitaminozelor se corelează cu scăderea cantităţii de proteine sau excesul de glucide în raţia alimentară, cu intensificarea funcţiilor unor organe, cu modificarea sintezei sau degradarea vitaminelor în bolile infecţioa-

se etc.

Biosinteza vitaminelor în organismul animal şi vegetal se poate realiza din precursori specifici numiţi provitamine.

Unele substanţe organice naturale şi sintetice au o structură asemănătoare cu cea a diverselor vitamine.Aceste substanţe se numesc antivitamine,întrucît prin introducerea lor în organismul animal se observă simptomele cauzate de insuficienţa vitaminelor analoage.Acţiunea majorităţii antivitaminelor se explică prin formarea unor complecşi inactivi ca rezultat al substituirii coenzimelor din compoziţia enzimelor bicomponente.

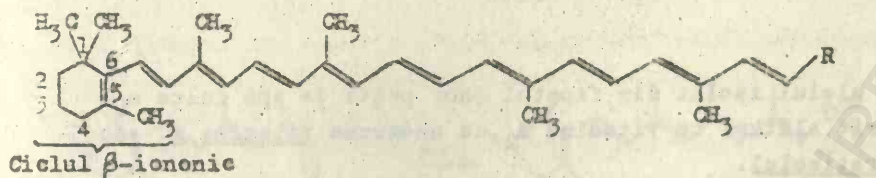
13.2.VITAMINE LIPOSOLUBILE

In această grupă intră vitaminele care au o singură proprietate comună - solubilitatea în acilgliceroli(grăsimi).Structura chimică,acţiunea biologică şi răspîndirea în natură diferă de la o vitamină la alta.Dacă hrana conţine cantităţi de vitamine liposolubile mai mari decît necesită organismul animal,acesta le poate depozita sub formă de rezerve în unele organe şi ţesuturi.

13.2.1.Vitamina A(retinol,vitamina antixeroftalmică)

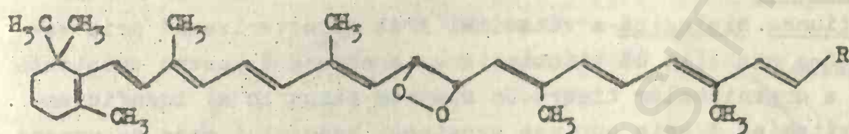
Vitamina A se formează în organismul animal prin scindarea carotenoidelor C_{40} conţinînd cel puţin un ciclu β-iononic. Cele mai importante carotenoide cu rol de provitamine A sînt α-carotenul,β-carotenul,γ-carotenul şi criptoxantina(3-hidroxi-β-carotenul)(fig.8.3) care se găsesc în plante,alge şi microorganisme. Animalele nu posedă capacitatea de a sintetiza carotenoide,însă le obţin cu hrana vegetală.Cercetări recente sugerează că β-carotenul este un posibil agent protector împotriva unor forme de cancer.

Vitamina A se formează în ţesuturile animale prin oxidarea provitaminelor A.Sub acţiunea β-caroten-15,15'-dioxigenazei se rupe dubla legătură centrală din catena hidrocarbonată a moleculei de provitamină A şi rezultă aldehida vitaminei A_1,numită retinal(fig.13.1,etapele a şi b).Enzimele care realizează scindarea oxidativă a carotenilor se descoperă în citosolul celulelor din intestinul,ficatul şi rinichii diferitelor animale.Prin

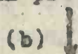


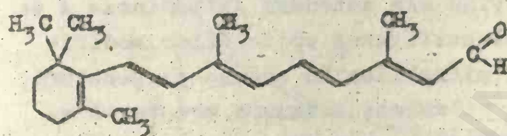
Provitamină A





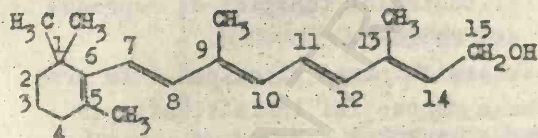
Peroxidul provitaminei A





Allo-trans-Retinal(Aldehida vitaminei A_1)





Allo-trans-Retinol(Vitamina A_1)

Fig.13.1.Formarea vitaminei A_1 din caroteni.

reducerea retinalului în prezenţa <u>retinoldehidrogenazei</u> se obţine <u>retinolul</u> sau <u>vitamina A_1</u>(fig.13.1,etapa c).

Vitamina A este prezentă în ţesuturile animale atît sub formă de alcool liber cît şi sub formă de esteri cu acidul palmitic. Vitamina A reprezintă una din puţinele vitamine care poate să se acumuleze în organismul animal în cantităţi relativ mari.Ea se depozitează mai ales ca palmitat de retinil în ficat.

In uleiul izolat din ficatul unor pești de apă dulce s-a descoperit, alături cu vitamina A_1, de asemenea vitamina A_2 sau 3-dehidroretinolul.

In sînge vitamina A este transportată sub forma unui complex cu o proteină specifică ce leagă retinolul, proteină aparținînd prealbuminelor.

Acțiunea biologică a vitaminei A se caracterizează prin varietate. S-a stabilit că vitamina A este necesară pentru creșterea normală a organismelor tinere. Un simptom timpuriu al insuficienței de vitamină A este oprirea creșterii țesutului osos ca urmare a diminuării sintezei de condroitinsulfat. Indeosebi vitamina A intervine în procesele metabolice ale țesuturilor epiteliale și, în general, ale țesuturilor derivînd din ectoderm. Avitaminoza A se asociază cu cheratinizarea și stratificarea epiteliilor, modificări ce facilitează pătrunderea microbilor în organe și țesuturi, dovedind rolul antiinfecțios al vitaminei A. Asupra creșterii animalelor exercită efect nu vitamina A ca atare, ci metabolitul rezultat prin oxidarea ei - acidul retinoic.

Vitamina A influențează, de asemenea, procesul reproducerii. La animalele cu avitaminoză A se observă întreruperea spermatogenezei și resorbția embrionului. Controlul funcției de reproducere este efectuat de retinol sau retinal.

Cel mai bine studiată este participarea vitaminei A în procesele fotochimice aflate la baza percepției luminii. Radiația electromagnetică căzută pe retina ochiului este adsorbită de celulele fotoreceptoare (bastonașe și conuri) care o transformă în energie chimică și apoi în impuls nervos. Funcția bastonașelor din retina majorității vertebratelor depinde de prezența unei substanțe fotosensibile numită rodopsină (purpură vizuală). Aceasta este o cromoproteină alcătuită din proteina opsină și gruparea prostetică 11-cis-retinal. Sub acțiunea luminii rodopsina se scindează în opsină (incoloră) și allo-trans-retinal, cu formarea unor intermediari avînd proprietăți spectrale distincte (fig.13.2). Izomerizarea 11-cis-retinalului, atașat la rodopsină, în allo-trans-retinal (ecuația 13.1) constituie prima reacție în excitația vizuală.

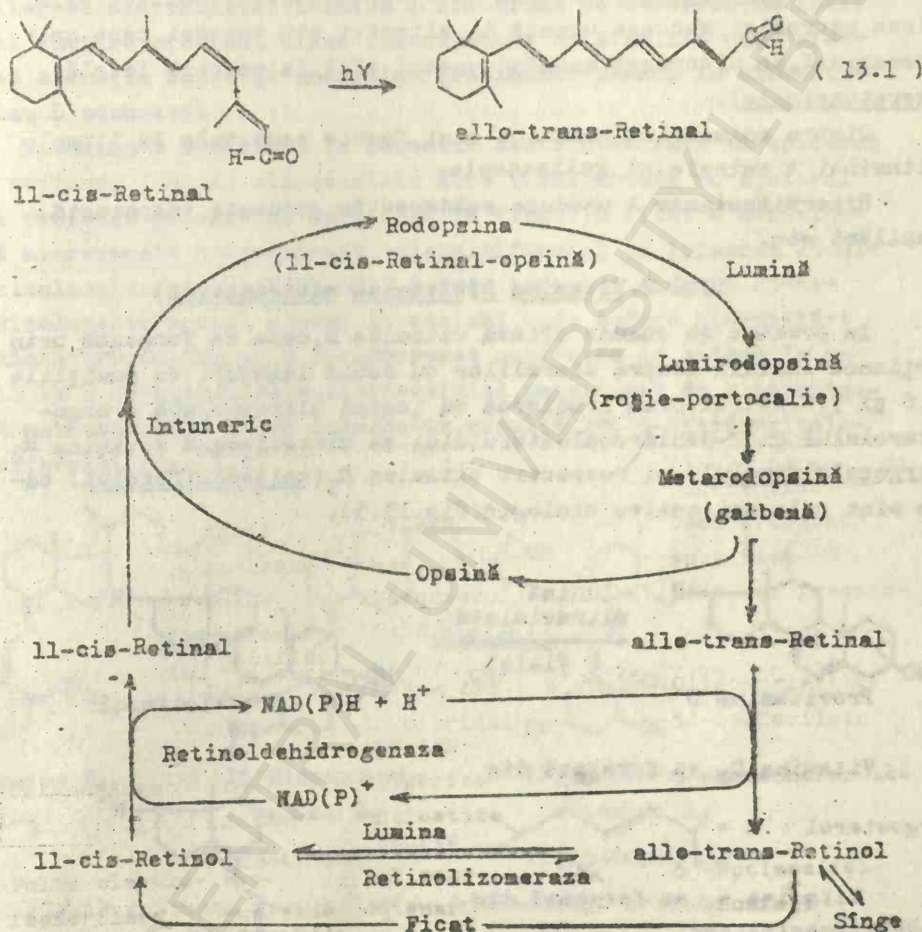


Fig.13.2.Schema participării vitaminei A în procesul vederii.

In retină s-a descoperit retinoldehidrogenaza care catalizează reducerea retinalului în retinol.Se presupune că allo-trans-retinolul se transformă în 11-cis-retinol sub acţiunea <u>retinolizomerazei</u>,însă despre această enzimă nu se cunoaşte încă nimic.Din 11-cis-retinal şi opsină,fără consum de energie şi la întuneric,se regenerează rodopsina(fig.13.2).

In carenţa de vitamină A resinteza rodopsinei decurge mai încet decît în condiţii normale şi aceasta duce la <u>hemeralopie</u>

(orbul găinilor) care se manifestă prin incapacitatea bolnavilor de a se adapta la întuneric. Dacă avitaminoza A este accentuată, se instalează xeroftalmia, constînd în uscăciunea conjunctivei, prin lipsa secreţiei mucoase, urmată de alterări ale corneei, care se edemaţiază, se ulcerează, mergînd uneori pînă la necroză totală (keratomalacie).

Dintre animalele domestice sînt foarte sensibile la lipsa vitaminei A suinele şi galinaceele.

Hipervitaminoza A produce scăderea în greutate, inapetenţă, depilări etc.

13.2.2. Vitamina D (vitamina antirahitică)

In prezent se cunosc cîteva vitamine D, care se formează prin acţiunea luminii asupra sterolilor cu duble legături în poziţiile 5,6 şi 7,8. Astfel, prin iradierea cu lumină ultravioletă a ergosterolului şi 7-dehidrocolesterolului se sintetizează vitamina D_2 (ergocalciferolul) şi respectiv vitamina D_3 (colecalciferolul) care sînt cele mai active biologic (fig.13.3).

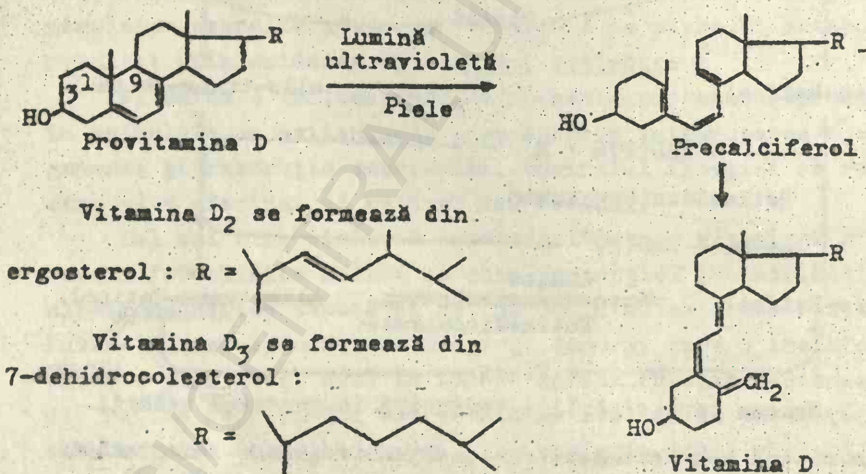


Fig.13.3. Biogeneza vitaminelor D_2 şi D_3.

Acţiunea biologică a vitaminei D constă în reglarea metabolismului calciului şi fosforului, condiţionînd formarea normală a ţesutului osos. Cercetări relativ recente au stabilit că vitamina

D își exercită efectele sale reglatoare prin intermediul metaboliților ei hidroxilați. Vitamina D din hrană se absoarbe în intestinul subțire, procesul fiind favorizat de bilă. Bolile care afectează secreția bilei și absorbția grăsimilor conduc la hipovitaminoza D secundară.

Vitamina D absorbită în intestin sau sintetizată în epidermă sub acțiunea luminii ultraviolete este transportată cu ajutorul unei proteine plasmatice specifice la ficat. In ficat o monoxigenază microsomală hidroxilează colecalciferolul cu formarea 25-hidroxicolecalciferolului(25-OH-D_3). Prin torentul sanguin 25-hidroxicolecalciferolul ajunge în rinichi, unde suferă hidroxilări suplimentare. Astfel, prin încorporarea unui atom de oxigen în poziția 1α a 25-hidroxicolecalciferolului, catalizată de o monoxigenază mitocondrială NADPH dependentă, rezultă 1α,25-dihidroxicolecalciferolul(fig.13.4).

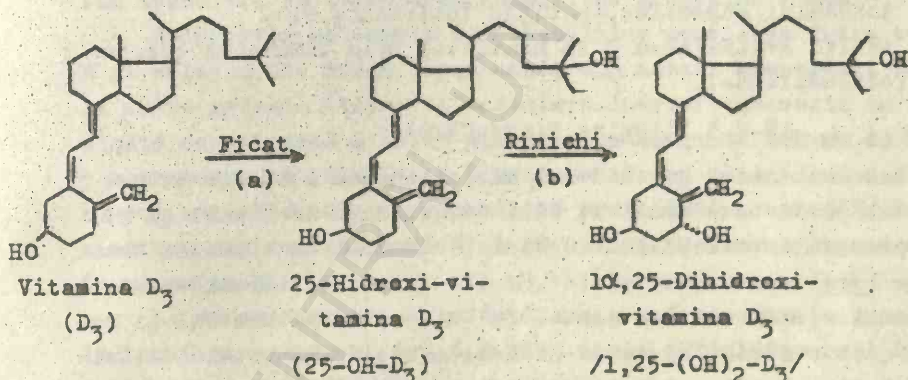


Fig.13.4. Schema reacțiilor de hidroxilare a vitaminei D_3.
(a) : 25-hidroxilaza vitaminei D ;
(b) : 1-hidroxilaza 25-hidroxi-vitaminei D.

1α,25-Dihidroxicolecalciferolul constituie principala formă activă, răspunzătoare direct de realizarea funcțiilor vitaminei D în procesul de transfer transmembranar al calciului și fosforului.

Intrucît 1α,25-dihidroxi-vitamina D_3 se sintetizează în rinichi și acționează la nivelul intestinului, ea poate fi considerată ca un hormon steroidic. La bolnavii cu afecțiuni ale rinichi-

lor adesea se observă o demineralizare însemnată a oaselor.

1α,25-Dihidroxi-vitamina D_3 stimulează absorbţia ionilor de calciu în mucoasa intestinală.Probabil,acest derivat hidroxilat, asemănător altor hormoni steroidici,îşi realizează acţiunea la nivelul reglării transcrierii.Administrarea vitaminei D animalelor de experienţă conduce la creşterea proteinelor care leagă calciu şi participă la absorbţia acestui ion în intestin.1α,25-Dihidroxi-vitamina D_3 influenţează,de asemenea,celulele osului,unde determină o mobilizare a ionilor de calciu.Totodată, 1α,25-dihidroxi-vitamina D_3 creşte reabsorbţia fosfatului anorganic în rinichi.

Lipsa vitaminei D în hrana animalelor tinere şi a copiilor duce la rahitism,maladie care are ca trăsătură principală încetinirea procesului de mineralizare a oaselor în creştere.La copii suferinzi de rahitism se observă modificări ale sistemului schaletic : cap mare neproporţional,torace modificat,bazin plat,membre inferioare deformate.Alte simptome ale rahitismului sînt tulburarea tonusului muşchilor,dentiţia întîrziată etc.

La adulţi avitaminoza D se manifestă prin înmuierea ţesutului osos(osteomalacie).

13.2.3.Vitamina E(tocoferol)

In natură există şapte forme ale vitaminei E,cărora li s-a dat denumirea de tocoferoli.Ei sînt sintetizaţi de plante şi se găsesc predominant în uleiul vegetal.Structural tocoferolii derivă de la tocol sau 2-metil-2-(4',8',12'-trimetiltridecil)-6-hidroxicroman.Tocoferolii se deosebesc între ei după numărul şi poziţia grupelor metil legate de nucleul aromatic al tocolului.Cel mai răspîndit şi cel mai activ este α-tocoferolul sau 5,7,8-trimetiltocolul(fig.13.5).In cantităţi mai mici se găsesc,de asemenea,β-,γ- şi δ-tocoferolii.

Acţiunea biologică a vitaminei E nu este pe deplin elucidată. Funcţia principală a tocoferolilor constă în proprietatea lor de antioxidanţi,protejînd lipidele nesaturate de oxidare.In acest rol tocoferolii pot apăra membranele lipidice de acţiunea radicalilor liberi,răspunzători de formarea peroxizilor organici.Se presupune că tocoferolilor le revine chiar un rol biologic mai specific,de componenţi structurali ai membranelor celulare şi

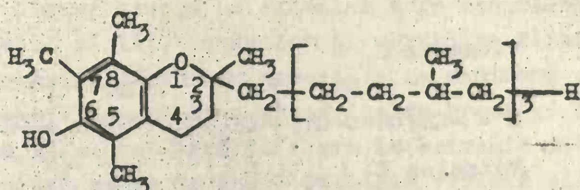


Fig.13.5.Structura chimică a α-tocoferolului(5,7,8-trimetil-tocolului).β-Tocoferolul conţine hidrogen în poziţia 7.γ-Tocoferolul conţine hidrogen în poziţia 5.δ-Tocoferolul conţine hidrogen în poziţiile 5 şi 7.

insuficienţa vitaminei E conduce la alterarea acestora şi permeabilităţii lor.

Avitaminoza E la animale se manifestă printr-o serie de simptome tipice,între care cele mai caracteristice sînt distrofia musculară şi tulburarea funcţiilor glandelor sexuale.

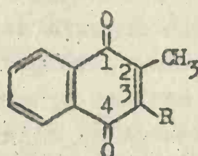
Comparativ,nu demult s-a stabilit o corelaţie între vitamina E şi seleniu din hrană.Lipsa unuia din aceşti componenţi cauzează la multe animale distrofia musculară.Intrucît şoarecii cu insuficienţă de vitamină E au,de asemenea,un conţinut scăzut de Se^{2-}, s-a presupus că vitamina E previne oxidarea seleniului redus.La rîndul său,seleniu este capabil să preîntîmpine apariţia unor simptome ale avitaminozei E şi să reducă necesarul organismului în vitamina E.

La om avitaminoza E se întîlneşte mai rar.Foarte sensibile la insuficienţa de vitamină E sînt unele animale(şoareci,iepuri, cobai,viţei,miei,raţe).

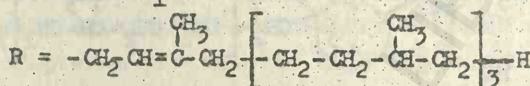
13.2.4.Vitamina K(vitamina antihemoragică)

Denumirea generală de vitamină K se atribuie unor derivaţi ai 2-metil-1,4-naftochinonei,avînd hidrogenul din poziţia 3 substituit cu o catenă laterală.

In lucernă,spanac,cereale etc. se găseşte vitamina K_1(2-metil-3-fitil-1,4-naftochinona) sau filochinona care are drept catenă laterală restul fitil.O serie de bacterii sintetizează vitamina K_2(2-metil-3-difarnezil-1,4-naftochinona) sau farnochinona în care R este radicalul difarnezil(fig.13.6).



Vitamina K_1 :



Vitamina K_2 :

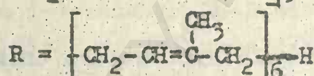
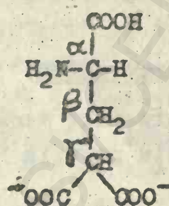


Fig.13.6.Formula generală şi structura catenei laterale a vitaminelor K naturale.

Activitate de vitamină K posedă o serie de combinaţii sintetice obţinute de la naftochinonă.Astfel,2-metil-1,4-naftochinona (menadi..na) sau vitamina K_3 are aceeaşi activitate ca şi vitamina K_1.

Funcţia biochimică a vitaminei K se corelează cu mecanismul de coagulare a sîngelui.In ultima etapă a acestui mecanism în cascadă,trombina scindează o peptidă de la fibrinogen şi îl transformă în fibrină insolubilă.Trombina se formează din protrombină, sub acţiunea trombokinazei şi în prezenţa altor factori din sistemul de coagulare a sîngelui(factorii VII,IX şi X).Lipsa vitaminei K în organismul animal conduce la diminuarea capacităţii de coagulare a sîngelui,datorită conţinutului scăzut de protrombină şi a unor factori de coagulare.Vitamina K este necesară pentru sinteza în ficat a protrombinei şi a factorilor menţionaţi.Influenţa vitaminei K constă în favorizarea formării γ-carboxiglutamatului prin grefarea de grupe -COOH suplimentare la resturile de acid glutamic din protrombina preformată. Probabil,unei modificări posttranscripţionale analoage i se supun şi alţi factori din sistemul de coagulare a sîngelui.In urma reacţiei de γ-carboxilare creşte capacitatea proteinelor respective de a lega ionii de calciu care,de asemenea,participă la mecanismul de coagulare a sîngelui.

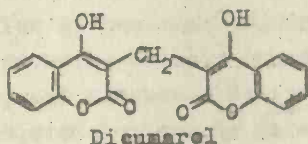


Acid γ-carboxiglutamic

Vitamina K poate îndeplini şi funcţia de oxidant în lanţul de transfer al electronilor la unele bacterii.In plus, se presupune că la E.coli şi micobacterii vitamina K_2 ar avea rol de coenzimă specifică în biosinteza acidului orotic.

Insuficienţa de vitamină K se manifestă prin hemoragii la nivelul pielii, mucoaselor şi muşchilor. Vitamina K este necesară, în special, păsărilor domestice. La mamifere şi om cerinţele în această vitamină sînt acoperite de hrană şi de cantitatea de vitamină K_2 sintetizată de flora intestinală. Avitaminoza K la om se constată numai în unele boli ale vezicii biliare şi în absorbţia defectuoasă a acilglicerolilor (grăsimilor).

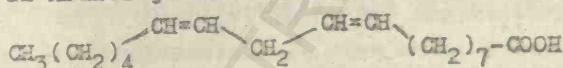
Se cunosc multe substanţe cu acţiune antagonistă vitaminei K. Una din primele antivitamine K descoperite este dicumarolul care se formează în trifoiul intrat în putrefacţie. Toate antivitaminele K provoacă hemoragii în organismul animal. Antivitaminele K au mare importanţă practică, putînd fi folosite cînd există pericolul coagulării sîngelui în vasele sanguine (infarct, tromboflebite etc.).



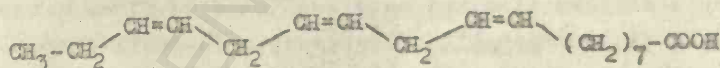
Dicumarol

13.2.5. Vitamina F (Acizi graşi nesaturaţi neînlocuibili)

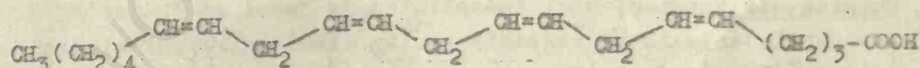
Acizii graşi polinesaturaţi, ca, de exemplu, acizii linolic, linolenic şi arachidonic (fig.13.7) sînt componenţi neînlocuibili ai hranei şi manifestă activitate vitaminică.



Acid linolic



Acid linolenic



Acid arachidonic

Fig.13.7. Structura acizilor graşi nesaturaţi biologic activi.

Acizii graşi neînlocuibili îndeplinesc importante funcţii: componenţi ai diferitelor fosfolipide, conferind membranelor celulare fluiditatea necesară; precursori în biosinteza prostaglandinelor etc.

Avitaminoza F se asociază cu o creştere deficitară, boli ale pielii, afecţiuni renale.

13.3. VITAMINE HIDROSOLUBILE

13.3.1. Tiamina (Vitamina B_1, aneurina)

Tiamina reprezintă prima vitamină care a fost izolată în stare pură (C. Funk, 1911).

Molecula tiaminei conţine două heterocicluri substituite, unul pirimidinic şi altul tiazolic, unite între ele printr-o grupă metilenică (fig.13.8, a).

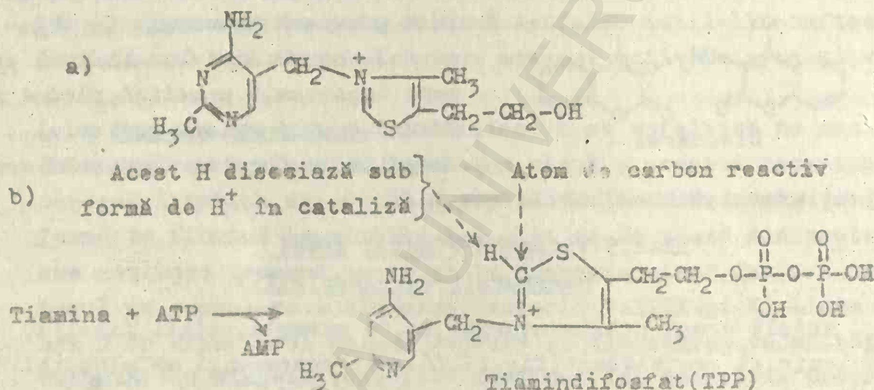


Fig.13.8. Structura tiaminei (a) şi biosinteza tiamindifosfatului (b).

Tiamina se sintetizează în plante şi numeroase microorganisme. La animale sinteza tiaminei este realizată de flora intestinală. In celula vie tiamina liberă se găseşte în cantitate neînsemnată şi probabil nu are o funcţie specifică. Funcţiile biochimice ale tiaminei sînt îndeplinite de forma sa fosforilată. Ţesuturile animale şi vegetale conţin tiamin-pirofosfokinaza care în prezenţa ATP fosforilează tiamina cu formarea tiamindifosfatului sau tiaminpirofosfatului (TPP) (fig.13.8, b). Mono-, tri- şi tetrafosfaţii tiaminei, de asemenea se întîlnesc în natură, însă în cantităţi mai mici. Tiamindifosfatul reprezintă coenzima enzimelor implicate în următoarele tipuri de reacţii :

1) decarboxilarea cetoacizilor cu formarea aldehidelor şi dioxidului de carbon ;

2)decarboxilarea oxidativă a α-cetoacizilor şi

3)reacţia transcetolazică de transfer a restului de glicolaldehidă de la un cetozofosfat la un aldozofosfat.

Hipovitaminoza B_1 începe cu pierderea poftei de mîncare,oboseală şi tulburări gastrointestinale.In stadiul de avitaminoză B_1 se produc modificări degenerative ale sistemului nervos,sistemului cardiovascular,muşchilor şi tractului gastrointestinal.Avitaminoza B_1 este cunoscută la om sub numele de béri-béri,iar la animale şi păsări se numeşte polinevrită.Simptomele avitaminozei B_1 se pot corela cu dereglări ale metabolismului glucidelor,aminoacizilor şi proteinelor.Diminuarea conţinutului de tiamindifosfat în ţesuturile animale cauzează creşterea piruvatului,ceea ce influenţează procesele de transaminare şi raportul amineacizilor în celulă,scade viteza de formare a acetil-CoA etc.Modificările proceselor metabolice conduc la leziuni ale ţesuturilor nervos şi muscular şi alterarea corespunzătoare a funcţiilor multor organe.

Avitaminoza B_1 poate să apară în tireotoxicoză,alcoolismul cronic,poliomelită,reumatism etc.,fiind favorizată de absorbţia deficitară a tiaminei sau distrugerea ei de microflora patologică din intestin.

13.3.2.Riboflavina(Vitamina B_2)

Riboflavina(vitamina B_2) are molecula alcătuită dintr-un nucleu izoaloxazinic la care se grefează două grupe metil şi un rest de ribitol(fig.13.9).

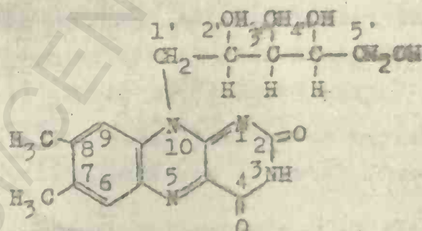


Fig.13.9.Structura riboflavinei.

Plantele superioare,levurile,ciupercile şi multe bacterii pot realiza sinteza riboflavinei.Animalele nu sintetizează această vitamină,însă în tractul gastro-intestinal există microorganisme care aprovizionează cu riboflavină organismul-gazdă.Omul, maimuţa,cîinele,suinele şi păsările au nevoie de un aport zilnic

de vitamină B_2.

Vitamina B_2 se depozitează parţial în ficat şi se elimină predominant în urină.

In celula vie riboflavina participă la sinteza flavinmononucleotidului(FMN),flavinadenindinucleotidului(FAD) şi altor analogi cu nucleu izoaloxazinic.FMN şi FAD reprezintă coenzimele enzimelor flavinice care au o însemnătate esenţială,catalizînd numeroase reacţii de oxidare în metabolismul glucidelor,lipidelor şi proteinelor.

Avitaminoza care apare în carenţa de vitamină B_2 se numeşte ariboflavinoză.In lipsa de riboflavină se constată oprirea creşterii organismelor tinere,ulceraţii ale pielii şi mucoaselor,afecţiuni oculare,slăbirea muşchilor.In formele severe de ariboflavinoză se produc tulburări ale sistemului nervos,exprimate prin paralizia membrelor.

Simptomele caracteristice ale avitaminozei B_2 la om sînt: leziuni ale mucoasei cavităţii bucale şi limbii,leziuni ale buzelor(cheilită),dermatite seboreice pe aripele nasului,pleoape şi urechi.De asemenea,se observă tulburări ale ochilor,caracterizate prin conjunctivită,lăcrimare,fotofobie,arsuri în ochi,diminuarea acuităţii vizuale.

13.3.3.Vitamina B_6(Piridoxina,adermina)

Conform noii terminologii,sub numele de piridoxină se înţelege o triadă de substanţe,cu activitate de vitamină B_6,din care fac parte piridoxolul,piridoxalul şi piridoxamina(fig.13.10).

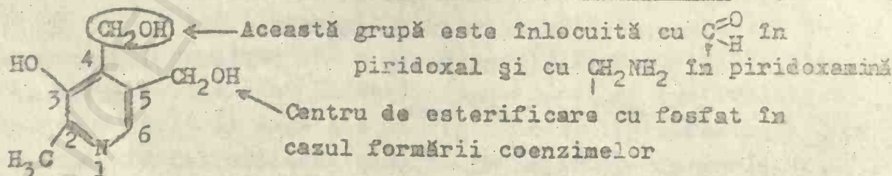


Fig.13.10.Familia vitaminei B_6 : piridoxolul,piridoxalul şi piridoxamina.

In organismele vii cei trei reprezentanţi ai vitaminei B_6 se găsesc liberi şi sub formă de esteri fosforici.Ţesuturile animale conţin predominant piridoxal,piridoxamină şi esterii lor fosforici.In plante şi unele microorganisme se sintetizează mai ales

piridoxolul şi piridoxol-5'-fosfatul care se pot oxida în piridoxal-5'-fosfat, iar ultimul prin transaminare trece în piridoxamin-5'-fosfat.

Funcţiile biologice ale vitaminei B_6 sînt îndeplinite de piridoxal-5'-fosfat şi piridoxamin-5'-fosfat. Aceşti doi derivaţi intră în calitate de coenzime în structura multor enzime care catalizează transformările biochimice ale aminoacizilor şi altor combinaţii conţinînd azot.

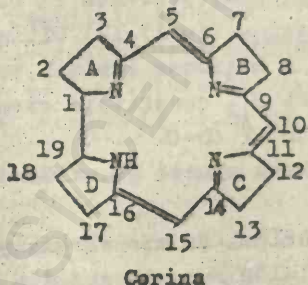
Simptomele principale ale avitaminozei B_6 la animale se exprimă în oprirea creşterii tineretului, dermatite specifice, modificări degenerative ale sistemului nervos, anemie.

13.3.4. Grupa vitaminei B_{12} (Corinoide)

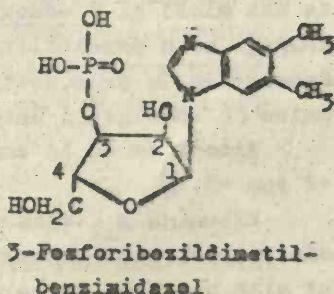
In conformitate cu noua nomenclatură, termenul de corinoide desemnează formele vitaminei B_{12}.

Corinoidele sînt combinaţii chimice unice sub raportul structurii şi activităţii lor biologice. Molecula corinoidelor conţine două părţi principale : un macrociclu corinic substituit avînd central un atom de cobalt şi un nucleotid cu legătură α-glicozidică.

Sistemul corinic al vitaminei B_{12} se aseamănă cu nucleul porfirinic. Scheletul corinic, numit corină, este construit din patru inele pirolice parţial hidrogenate (fig.13.11). Inelul pirolidinic



Corina



3-Fosforibozildimetil-benzimidazol

Fig,13.11. Structura scheletului corinic (corina) şi nucleotidului din molecula vitaminei B_{12}.

D este legat direct cu inelul pirolinic A, iar celelalte se unesc prin punţi metinice, ca în porfirină.

La exteriorul ciclului corinic al vitaminei B_{12} se găsesc

ca substituenţi laterali : opt grupe metil(în poziţiile 1,2,5,7, 12,12',15,17),trei resturi acetamidice(în poziţiile 2,7,18),trei resturi propionamidice(în poziţiile 3,8,13) şi un rest de acid propionic în poziţia 17.In centrul macrociclului corinic se află un atom de cobalt cu numărul de coordinaţie 6,care se leagă prin intermediul atomilor de azot ai celor patru inele pirolice.Al cincilea ligand al cobaltului,situat sub planul corinic este nucleotidul conţinînd 5,6-dimetilbenzimidazolul(DMB) care se leagă cu ribozo-3-fosfatul printr-o legătură α-glicozidică(fig.13.11).Acest nucleotid neobişnuit coordinează laatomul de cobalt cu unul din atomii de azot ai dimetilbenzimidazolului,iar cu acidul fosforic se leagă prin intermediul D-1-amino-2-propanolului cu restul de acid propionic din poziţia 17 a ciclului corinic.Prezenţa dimetilbenzimidazolului determină activitatea vitaminei B_{12} pentru organismele superioare.Complexul alcătuit din partea corinică şi nucleotidul menţionat poartă numele de cobalamină.Al şaselea ligand al cobaltului este localizat deasupra planului corinic şi poate fi CN^-,OH^-,$-CH_3$ sau restul 5'-deoxiadenozil.Derivatul cu anionul CN^-,numit ciancobalamină(fig.13.12) nu se formează in vivo, ci rezultă în procesul de izolare a vitaminei B_{12} din sursele naturale.După datele actuale,în natură există hidroxicobalamina, conţinînd anionul OH^-,precum şi formele coenzimatice ale vitaminei B_{12},între care se numără metilcobalamina(prezentă în cantitate mai mică) şi 5'-deoxiadenozilcobalamina(fig.13.12).Ultimii doi compuşi au o sensibilitate deosebită la acţiunea luminii,care îi descompune.In plus,coenzimele vitaminei B_{12} constituie exemple unice de combinaţii naturale cu legături σ Co-C.

Atomul de Co în corinoide poate avea starea de oxidare +1, +2 sau +3.

Vitamina B_{12} este produsă în principal de microorganismele din tractul gastrointestinal al animalelor rumegătoare,din sol şi alte nişe ecologice.

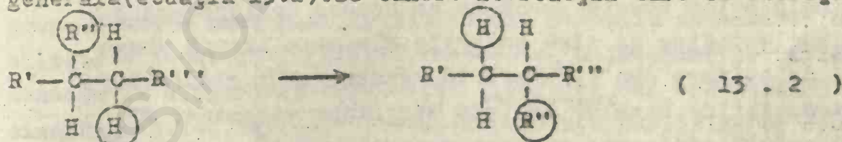
Acţiunea biologică a corinoidelor.Vitamina B_{12} participă la metabolismul glucidelor,lipidelor şi proteinelor,sub forma celor două coenzime indicate deja.Enzimele dependente de coenzimele corinoidice catalizează două tipuri de reacţii.

Metilcobalamina

5'-Deoxiadenozil-
cobalamina

Fig.13.12. Structura chimică a ciancobalaminei şi formelor coenzimatice ale vitaminei B_{12}. In cazul metilcobalaminei şi 5'-deoxiadenozilcobalaminei, pătratul desemnează sistemul corinic, iar DMB - dimetilbenzimidazolul.

In reacţiile de primul tip, sub acţiunea enzimelor avînd coenzimă 5'-deoxiadenozilcobalamina, are loc rearanjarea atomului de hidrogen şi a diferitelor grupe chimice, după următoarea schemă generală (ecuaţia 13.2). Se cunosc 10 reacţii care se desfăşoară



după acest mecanism, ca de exemplu izomerizarea metilmalonil-CoA în succinil-CoA, conversia glutamatului în β-metilaspartat, reducerea ribonucleozidtrifosfaţilor etc.

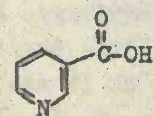
Pentru a doua categorie de reacţii este caracteristic trans-

ferul grupei metil(transmetilare) cu participarea enzimelor metilcobalaminice. Ca exemple de transmetilare pot fi date sinteza metioninei, formarea anaerobă a metanului de către bacterii, sinteza acetatului din CO_2, metilarea proteinelor, ARNt şi ADN.

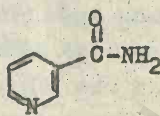
Carenţa de vitamină B_{12} în organismul omului şi animalelor produce tulburarea procesului de eritropoieză, conducînd la scăderea numărului de eritrocite şi leucocite, apariţia formelor imature de eritrocite(reticulocite). In avitaminoza B_{12} de durată în organism se dezvoltă o anemie canceroasă, numită anemie pernicioasă. Pe lîngă aceste simptome specifice avitaminozei B_{12}, se observă deranjamente gastro-intestinale, încetinirea creşterii, leziuni nervoase şi deteriorarea funcţiei de reproducere a urmaşilor.

13.3.5. Vitamina PP(Vitamina B_5)

Sub acest termen se cunosc acidul nicotinic şi amida lui, cărora în ultimii ani li s-a atribuit denumirea de niacină şi respectiv nicotinamidă(fig.13.13.).



Niacina



Nicotinamida

Fig.13.13. Structura acidului nicotinic şi nicotinamidei

Acidul nicotinic(acidul piridin-β-carboxilic) se formează aproape în toate organismele vii. In majoritatea cazurilor, precursorul lui este triptofanul. Transformările metabolice ale niacinei în organismul animal conduc la diferiţi compuşi.

Insemnătatea biologică a acidului nicotinic este dată de faptul că el intră sub formă de nicotinamidă în compoziţia NAD^+ şi $NADP^+$. Enzimele avînd aceste coenzime se numesc dehidrogenaze nicotinamiddinucleotidice şi sînt anaerobe. Ele catalizează numeroase reacţii de oxidare sau reducere în metabolismul glucidelor, lipidelor, aminoacizilor, bazelor azotate etc. Lipsa vitaminei PP în organismul animal afectează sinteza enzimelor NAD^+- sau $NADP^+$-dependente şi ca urmare se dereglează procesele metabolice respective. Toate aceste modificări în metabolismul substanţelor se exteriorizează prin simptomele avitaminozei PP.

Carenţa de vitamină PP la om şi animale dă naştere unei

grave boli numită pelagră. Apariţia pelagrei este condiţionată, pe lîngă insuficienţa de vitamină PP şi de lipsa alter vitamine din complexul B, de asemenea, a proteinelor. Avitaminoza PP se caracterizează prin dermatite specifice ale pielii. Pe părţile corpului expuse la lumina solară se produc mai întîi eriteme, avînd o culoare roşie-maronie, apoi vezicări şi descuamări. In 40-50% din cazuri, pe mucoasa bucală se desvoltă o stomatită cu eroziuni şi ulceraţii. Totodată apar perturbări ale tractului digestiv (diaree) şi într-un stadiu mai avansat al bolii se observă grave dereglări ale sistemului nervos (pierderea memoriei, halucinaţii, demenţă). Totuşi, trăsătura specifică a pelagrei este dermatita.

Carenţa de vitamină PP afectează cel mai puternic suinele. Niacina este un factor important de creştere pentru păstrăvul curcubeu (*Salmo gairdneri* Rich.).

13.3.6. Biotina (Vitamina H)

Molecula biotinei este formată dintr-un inel tetrahidroimidazolic condensat cu un inel tetrahidrotiofenic, ultimul avînd drept catenă laterală acidul valerianic (fig. 13.14).

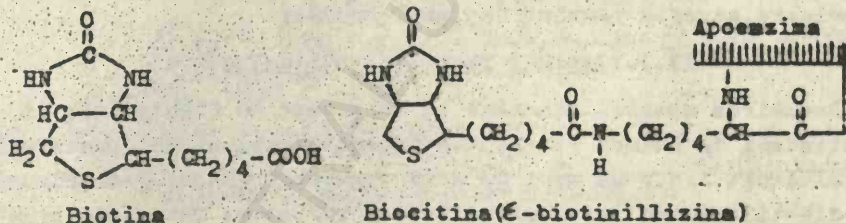
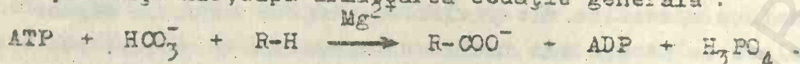


Fig. 13.14. Structura biotinei şi biocitinei.

Biotina joacă rolul de grupare prostetică a enzimelor implicate în activarea şi transportul CO_2. Intre -COOH biotinei şi grupa ε-NH_2 a unui rest de lizină din molecula apoenzimei se stabileşte o legătură peptidică. Proteoliza holoenzimelor biotinice conduce la eliberarea substanţei biocitina sau ε-N-biotinil-L-lizina (fig. 13.14). Enzimele biotin-dependente participă în sinteza glucidelor, lipidelor, aminoacizilor, nucleotidelor. Reacţiile catalizate de enzimele biotinice pot fi împărţite în două tipuri.

In prima serie sînt incluse reacţiile de carboxilare a derivaţilor acil-CoA, α-cetoacizilor etc. Aceste reacţii se desfăşoară

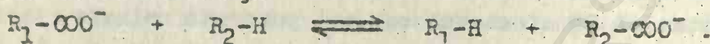
în prezența ATP,după următoarea ecuația generală :



$$ATP + HCO_3^- + R{-}H \xrightarrow{Mg^{2+}} R{-}COO^- + ADP + H_3PO_4 .$$

Ca exemple de asemenea reacții menționăm carboxilarea acetil-CoA cu formarea malonil-CoA și carboxilarea piruvatului la oxaliiacetat.

Din a doua grupă fac parte reacțiile de transcarboxilare,în care carboxilarea unui substrat are loc conjugat cu decarboxilarea altei substanțe :



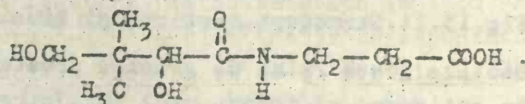
$$R_1{-}COO^- + R_2{-}H \rightleftharpoons R_1{-}H + R_2{-}COO^- .$$

Toate enzimele conținînd biotină sînt inhibate de glicoproteina <u>avidina</u> din albușul de ou.Legătura dintre avidină și biotină este atît de stabilă,încît introducerea albușului de ou crud în dieta animalelor duce la o insuficiență biotinică acută.

Carența biotinică la animale se manifestă printr-o dermatită de aspect seboreic,scăderea în greutate,paralizia membrelor posterioare,atrofia părului în jurul ochilor.

13.3.7.<u>Acidul</u> <u>pantotenic</u>(<u>Vitamina</u> <u>B_3</u>)

Denumirea acestei vitamine se corelează cu răspîndirea ei pretutindeni în natură vie(pantos=pretutindeni).Acidul pantotenic este alcătuit dintr-un rest de acid pantoic(acid D-α,γ-dihidroxi-β,β-dimetilbutiric) și unul de β-alanină,legate între ele printr-o legătură amidică :



$$HOCH_2{-}\underset{H_3C}{\overset{CH_3}{C}}{-}\underset{OH}{CH}{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}\underset{H}{N}{-}CH_2{-}CH_2{-}COOH .$$

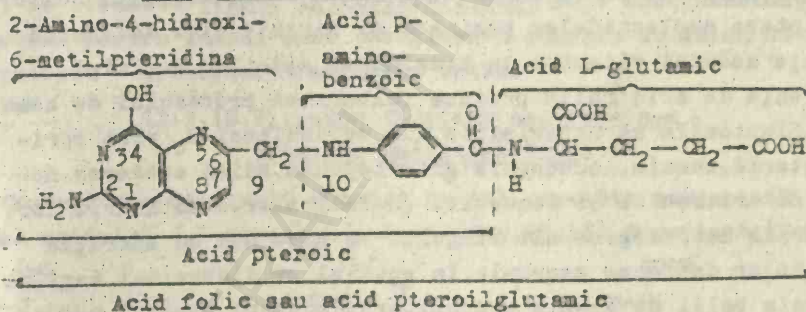
Acidul pantotenic se sintetizează în plantele verzi și majoritatea microorganismelor.

In celula vie funcția biochimică a acidului pantotenic se îndeplinește sub forma coenzimei A care intră în structura enzimelor din subclasa aciltransferazelor.Aceste enzime,catalizînd transferul radicalilor acil,participă în decarboxilarea acizilor α-cetonici,metabolismul acizilor grași,sterolilor,lipidelor,aminoacizilor și altor combinații chimice.Deci,acidul pantotenic este o vitamină cu rol deosebit în procesele metabolice ale organismelor vii.Lipsa acidului pantotenic în hrana animalelor afectează biosinteza coenzimei A,ceea ce cauzează tulburări grave ale

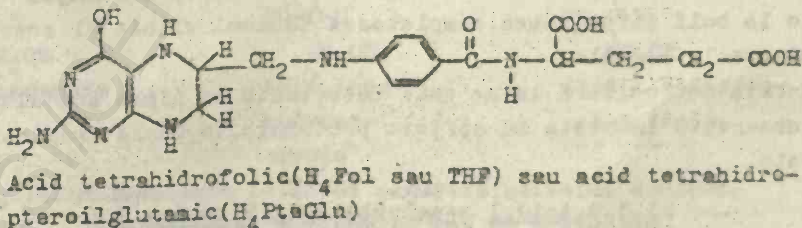
metabolismului glucidic şi lipidic. Carenţa de acid pantotenic la diferite animale se exteriorizează prin degenerescenţa măduvei spinării şi o dermită hiperkeratozică la puii de găină, o dermatită descumativă, depigmentizarea şi căderea părului, încetinirea creşterii la şoareci. La om, sindromul carenţial observat în malabsorbţie şi colitele disbacteriene este caracterizat de dermatită de tip seboreic, căderea părului, nevrită periferică.

13.3.8. Acidul folic (Vitamina B_c)

Acidul folic este alcătuit dintr-un rest pteridinic substituit, unul de acid p-aminobenzoic şi un rest de acid glutamic (fig. 13.15). Partea formată din pteridina substituită şi acidul p-aminobenzoic se numeşte <u>acid pteroic</u>, de aceea, adesea acidul folic poartă numele de <u>acid pteroilglutamic</u>.



Reducere



Acid tetrahidrofolic (H_4Fol sau THF) sau acid tetrahidropteroilglutamic (H_4PteGlu)

Fig. 13.15. Structura acidului folic şi a uneia din formele sale coenzimatice.

In celula vie acidul folic liber se întîlneşte în cantităţi mici; în general, sînt prezenţi derivaţii acidului folic cu nucleul pteridinic parţial hidrogenat şi conţinînd 1-7 resturi de acid L-

glutamic unite prin legătură amidică,formată de γ-COOH final.Cel mai important derivat al acidului folic este acidul 5,6,7,8-tetrahidrofolic(H_4Fol sau THF) sau acidul tetrahidropteroilglutamic (H_4PteGlu)(fig.13.15).

Mamiferele sînt incapabile să sintetizeze heterociclul pteridinic.Ele obţin acidul folic şi derivaţii lui în dietă sau graţie microorganismelor intestinale.

Rolul biochimic al acidului folic este îndeplinit de acidul tetrahidrofolic,care legat cu apoenzimele corespunzătoare,realizează transferul fragmentelor monocarbonice(C_1) : metil($-CH_3$) , metilen($-CH_2$) ,metenil($=CH$) ,formil($HC=O$) şi formimino($HC=NH$).Molecula acidului tetrahidrofolic leagă reversibil radicalii indicaţi la N-5 sau N-10 ori la ambii atomi de azot.Derivaţii formaţi sînt interconvertibili.Ei participă la multe reacţii biochimice implicate în metabolismul aminoacizilor,nucleotidelor şi altor substanţe.Participarea formelor coenzimatice ale acidului folic în biosinteza nucleotidelor purinice şi pirimidinice determină importanţa acestei vitamine în biosinteza acizilor nucleici.

Carenţa de acid folic produce tulburarea procesului de hematopoieză.Simptómele caracteristice ale avitamiozei B_c sînt oprirea creşterii,anemia,leucopenia şi citopenia,adică scăderea numărului de eritrocite şi leucocite şi întîrzierea maturării lor. Modificările morfologice ale sîngelui se asociază cu apariţia eritrocitelor de forme anormale,în special cu dimensiuni mari,de unde numele bolii de anemie macrocitară.In cazul anemiei macrocitare se constată dereglarea sintezei ADN.Inflamarea cavităţii bucale şi diareea ce adesea iau naştere datorită rezistenţei scăzute la boli infecţioase,completează tabloul clinic al acestei avitaminoze la animale.

Anemia macrocitară la om este favorizată de lipsa acidului folic,observată în dieta cu deficit proteinic,în boala tropicală sprue etc.

13.3.9.Acidul p-aminobenzoic(Vitamina H_1)

Acidul p-aminobenzoic($H_2N-C_6H_4-COOH$) este un factor de creştere,în special,pentru microorganismele care populează intestinul şi au capacitatea să sintetizeze diferite vitamine.In celula vie

acidul p-aminobenzoic are rolul de precursor în biosinteza acidului folic.De aceea acidul p-aminobenzoic este,de asemenea,necesar pentru unele animale şi om.

In lipsa acidului p-aminobenzoic se observă oprirea creşterii microorganismelor,depigmentizarea şobolanilor negri,scăderea greutăţii păsărilor şi alte simptome specifice carenţei de acid folic.

Dintre analogii structurali cu acţiune antagonistă acidului p-aminobenzoic prezintă importanţă deosebită sulfanilamida(H_2N-$-C_6H_4-SO_2NH_2$).Interacţiunile între aceste două combinaţii au un caracter strict concurent : dacă concentraţia sulfanilamidei se măreşte de două ori,atunci pentru înlăturarea inhibării creşterii bacteriilor se cere o concentraţie de două ori mai mare de acid p-aminobenzoic.Pe baza acestor date D.D.Woods(1940) şi P.Fildes (1940) au formulat teoria antimetaboliţilor.Cele două substanţe concurează pentru enzima care catalizează sinteza acidului dihidropteroic - precursorul acidului folic.

13.3.10.Vitamina C(Acidul ascorbic sau vitamina antiscorbutică)

Conform nomenclaturii chimice acidul ascorbic reprezintă -lactona acidului 2,3-dienol-L-gulonic(fig.13.16).Proprietăţile

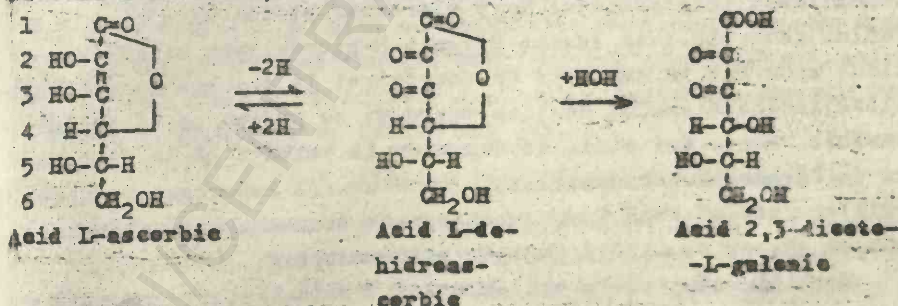


Fig.13.16.Structura acidului ascorbic,acidului dehidroascorbic şi produsului lui de hidroliză.

chimice specifice ale acidului ascorbic sînt caracterul slab acid condiţionat de hidrogenul enolic de la C-3 şi capacitatea de oxidare.Participarea acidului ascorbic la reacţiile de oxido-reducere este conferită de cele două gupe enolice din molecula sa care

se pot oxida ugor în grupe cetonice.Prin oxidarea acidului ascorbic se obţine acidul L-dehidroascorbic care are încă activitate vitaminică,dar este foarte instabil.In celula vie şi in vitro acidul dehidroascorbic poate fi uşor redus la acid ascorbic.Prin hidroliza inelului lactonic al acidului dehidroascorbic se formează acidul 2,3-diceto-L-gulonic(fig.13.16) care este lipsit de activitate vitaminică.

Numeroase specii de microorganisme,plante şi animale pot sintetiza acidul ascorbic din monoglucide.Primatele,cobaiul şi omul trebuie să primească vitamina C în hrană.

Acţiunea biologică a acidului ascorbic este strîns legată cu proprietăţile lui oxido-reducătoare.Acidul ascorbic are rol important în multe procese metabolice,unde acţionează ca transportor de hidrogen sau electroni.

S-a stabilit că acidul ascorbic participă în metabolismul aminoacizilor.Astfel,în catabolismul tirozinei acidul ascorbic protejează oxidaza acidului p-hidroxifenilpiruvic de efectul inhibitor al acidului homogentizinic care se formează în reacţia catalizată de această enzimă.

Multe hidroxilaze necesită prezenţa acidului ascorbic ca agent reducător.De exemplu,triptofan-5-hidroxilaza catalizează hidroxilarea triptofanului în 5-hidroxitriptofan cu ajutorul acidului ascorbic.Insă enzima DOPamin-β-hidroxilaza utilizează acidul ascorbic în calitate de cosubstrat în sinteza noradrenalinei(NA).Această enzimă conţine cupru şi se presupune,că acidul ascorbic reduce doi atomi de cupru de la valenţa +2 la +1.Reacţia de formare a noradrenalinei joacă un rol important în neuronii creierului,însă decurge intens,de asemenea,în suprarenale, unde se găsesc cantităţi mari de acid ascorbic.

Unul din simptomele avitaminozei C este o stare anormală a ţesutului conjunctiv.S-a stabilit că formarea colagenului în ţesuturile animale se desfăşoară cu participarea acidului ascorbic. Cercetările recente au arătat că acidul ascorbic este implicat în hidroxilarea prolinei,de asemenea,a lizinei.Apoi s-a descoperit că hidroxilarea se produce nu la nivelul aminoacizilor liberi, ci după încorporarea lor în lanţurile polipeptidice ale colagenului.

Insuficienţa acidului ascorbic în hrană produce hipovitaminoza C care se caracterizează prin oboseală rapidă, somnolenţă, pierderea poftei de mîncare.

In avitaminoza C sau scorbut se observă fragilitatea capilarelor pielii, asociată cu o tendinţă exagerată spre hemoragii şi o scădere a rezistenţei organismului animal la infecţii. Simptome caracteristice ale scorbutului sînt tumefierea şi hemoragiile gingiilor, urmate de dislocarea şi căderea dinţilor. In formele severe de scorbut hemoragiile pot să apară în muşchi şi organele interne. In avitaminoza C adesea are loc lezarea ţesutului osos şi cartilaginos.

La baza acestor semne clinice ale scorbutului se află tulburarea metabolismului aminoacizilor (tirozinei, prolinei, lizinei) şi sintezei colagenului. Se deregleză metabolismul glucidic: scade activitatea unor enzime care catalizează metabolismul glucozei (hexokinaza, fosfohexozoizomeraza, fosfoglucomutaza), este deranjată sinteza glicogenului etc. In avitaminoza C, de asemenea, se modifică metabolismul lipidic: creşte conţinutul acizilor graşi liberi în ţesuturi, precum şi cantitatea de colesterol sanguin şi tisular.

13.4. SUBSTANŢE CU ÎNSUŞIRI VITAMINICE

Unele substanţe naturale biologic active care nu îndeplinesc rolul de coenzime şi nici nu constituie nutrimente pentru organismul animal, avînd însă funcţii doar parţial elucidate, se consideră că sînt compuşi cu acţiuni similare vitaminelor. Exemple de astfel de substanţe se indică mai jos.

13.4.1. Vitamina P (Vitamina permeabilităţii)

Sub denumirea de vitamina P se înţelege o gamă de glicozide ale diferitelor flavone. Intre flavonglicozidele cu pronunţată activitate de vitamină P se numără rutina şi hesperidina (fig. 13.17), care conţin dizaharida rutinoza (6-β-L-ramnozidoglucoza).

Cele mai bogate în vitamină P sînt lămîile, portocalele, hrişca, ardeiul etc.

Vitamina P scade fragilitatea şi permeabilitatea capilarelor sanguine şi potenţează acţiunea vitaminei C. Este posibilă parti-

ciparea vitaminei P la procesele de oxido-reducere din organismele vegetale şi animale.

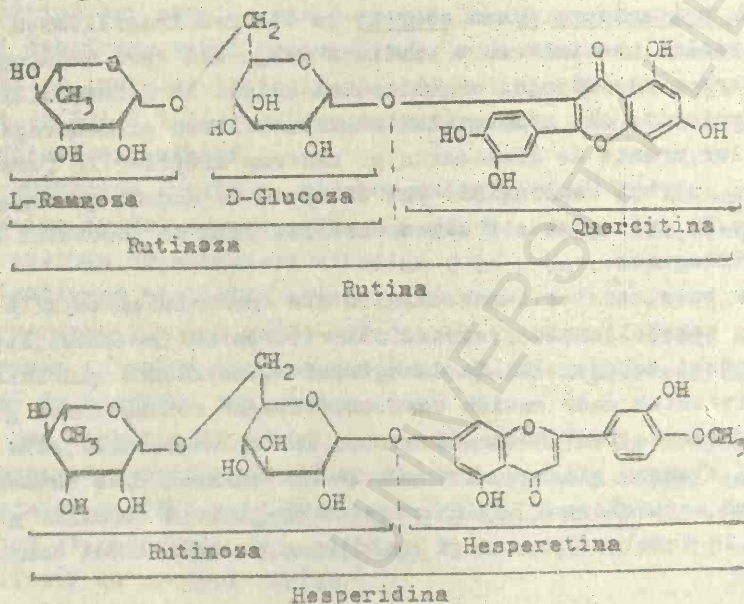
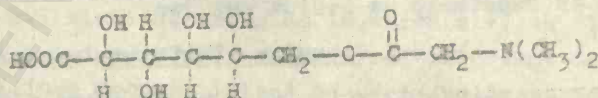


Fig.13.17.Formulele structurale ale celor mai active flavonglicozide.

13.4.2.Acidul pangamic(Vitamina B_{15})

Vitamina B_{15} naturală reprezintă esterul acidului D-gluconic cu acidul dimetilaminoacetic :



Deşi insuficienţa alimentară nu se observă,acidul pangamic exercită o acţiune multiplă asupra organismului animalelor şi omului.
1)Acidul pangamic are acţiune lipotropă conducînd la normalizarea metabolismului lipidic.Cercetări recente au dovedit că acidul pangamic este un donor de grupe metil în biosinteza creatinei,adrenalinei,metioninei,hormonilor steroidici etc.
2)Acidul pangamic activează metabolismul oxigenului în ţesuturi, crescînd stabilitatea celulelor miocardului faţă de starea de

hipoxie.

3)Acidul pangamic participă la procesele de detoxifiere,ceea ce s-ar putea explica prin capacitatea lui de transmetilare şi de intensificare a reacţiilor de oxidare.

13.4.3.Colina(Vitamina B_4)

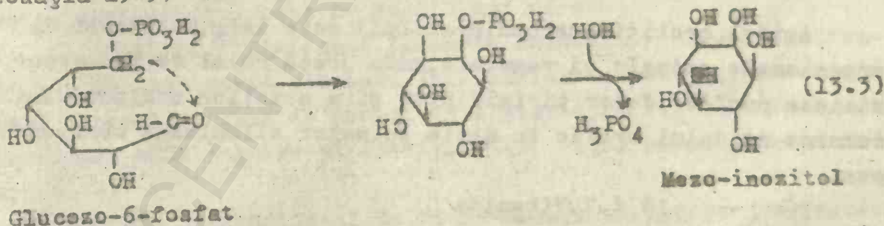
Colina/$(CH_3)_3\overset{+}{N}-CH_2-CH_2-OH$/ intră în compoziţia unei grupe largi de fosfolipide şi constituie unul din precursorii pentru sinteza acetilcolinei.

Importanţa biologică a colinei pentru organismul animal constă în acţiunea ei lipotropă,prin care se previne infiltraţia grasă a ficatului.Insuficienţa de colină în organismul animalelor inhibă sinteza fosfatidilcolinei în ficat,ceea ce influenţează negativ eliminarea acilglicerolilor din acest organ.In plus se mai observă hemoragii la nivelul rinichilor,anemie etc.

Carenţa de colină(ca şi cea de vitamină PP) nu poate să apară la animalele a căror dietă conţine o cantitate adecvată de proteine.

13.2.4.Mezo-inozitolul(Mioinozitolul)

Mezo-inozitolul(hexahidroxiciclohexanul) se întîlneşte în toate celulele vii,unde poate să se formeze din glucozo-6-fosfat (ecuaţia 13.3)



La animale mezo-inozitolul se sintetizează în cantitate limitată,din care cauză această substanţă este considerată vitamină.Mezo-inozitolul este necesar pentru sinteza fosfatidilinozitolilor în ficat.

La plante mezo-inozitolul intră în compoziţia galactinolului(4-α-D-galactozidoinozitol) care,probabil,este un precursor specific al poliglucidelor peretelui celular.In natura vie se află diferiţi esteri fosforici ai inozitolului.In seminţe se

găsește o cantitate mare de acid inozitolhexafosforic(acid fitinic),de obicei sub formă de sare de calciu sau sare mixtă de Ca^{2+} și Mg^{2+},numită fitină.

Mezo-inozitolul are o acţiune lipotropă,asemănătoare cu cea a colinei.In lipsa mezo-inozitolului în hrană,șoarecii cresc nesatisfăcător și parțial le cade părul,iar la șobolani se acumulează trigliceride în ficat.

13.4.5.Carnitina(Vitamina B_T)

Carnitina(γ-trimetilamino-β-hidroxibutiratul),cu următoarea structură chimică $(CH_3)_3\overset{+}{N}-CH_2-\underset{OH}{CH}-CH_2-COO^-$,este prezentă aproape în toate organismele vii,majoritatea lor fiind capabile să o sintetizeze.In cantitatea cea mai mare(0,1% din substanţa uscată) se găsește în mușchii animalelor.Tenebrio monitor și unele bacterii necesită carnitina ca factor exogen neînlocuibil.

In celula vie carnitina participă la transferul acizilor grași cu catenă lungă prin membrana mitocondrială.Insuficienţa exogenă de carnitină nu se cunoaște.In lipsa congenitală de carnitină se observă mușchi slabi și aglomerații de vacuole pline cu lipide.

13.4.6.Acidul orotic(Vitamina B_{13})

Acidul orotic(6-carboxiuracilul) este larg răspîndit în organismele animale și vegetale,unde joacă rolul de precursor în sinteza nucleotidelor pirimidinice și a acizilor nucleici.Introducerea acidului orotic în dieta suinelor stimulează hematopoieza.

13.4.7.Vitamina U

Vitamina U(S-metilmetionina : $(H_3C)_2\overset{+}{S}-CH_2-CH_2-\overset{NH_2}{CH}-COOH$) nu se sintetizează în organismul omului.Multă vitamină U se găsește în varză,tomate,praj,pătrunjel verde.

Vitamina U este un donor de grupe metil și are influenţă stimulatoare asupra proceselor metabolice din mucoasa peretelui stomacal și intestinal.Această vitamină exercită o acţiune favorabilă în vindecarea ulcerului stomacal și duodenal.

14. HORMONI

In sensul larg al înţelesului, hormonii sînt compuşi chimici specifici cu rol de mesageri, adică purtători de informaţii care determină reglarea anabolismului şi catabolismului substanţelor şi modularea mecanismelor morfo-funcţionale în celulele organismului viu. Termenul de hormon a fost utilizat prima oară în anul 1904 de William Bayliss şi Ernest Starling.

Hormonii se întîlnesc în organismul vertebratelor, nevertebratelor şi plantelor.

14.1. HORMONII VERTEBRATELOR

In organismul vertebratelor hormonii sînt sintetizaţi de glandele cu secreţie internă sau glandele endocrine. Unii hormoni se formează, de asemenea, în alte diverse ţesuturi şi celule ale organismului animal, de unde denumire de hormoni tisulari.

Sistemul hormonal al vertebratelor (şi nevertebratelor) este structurat după principiul ierarhiei (fig.14.1). Secreţia unui hormon se află sub controlul altor hormoni de un nivel mai ridicat, iar elaborarea acestora din urmă este coordonată şi controlată de sistemul nervos, prin regiunea sa hipotalamică. Sistemul nervos asigură o reglare rapidă şi relativ de scurtă durată, permiţînd o adaptare mult mai eficace a funcţiilor organismului la factorii mediului înconjurător. Sistemul hormonal lucrează mai încet, dar efectul acţiunii lui este de durată mai mare.

In condiţii fiziologice formarea hormonilor ca şi inactivarea lor se realizează constant. Intensificarea sau diminuarea sintezei hormonilor faţă de normal determină diferite abateri în metabolismul substanţelor şi apariţia unor stări patologice caracteristice.

Organele, ţesuturile şi celulele asupra cărora este orientată acţiunea predominantă a hormonilor se numesc organe-ţintă, ţesuturi-ţintă, celule-ţintă. Intrucît structura, funcţiile şi metabolismul lor depind de nivelul hormonilor în organism, aceste organe, ţesuturi şi celule, de asemenea, se denumesc hormonodependente. Cercetările au arătat că celulele-ţintă posedă receptori specifici de recunoaştere şi fixare a hormonilor. Hormonii pot acţiona asupra

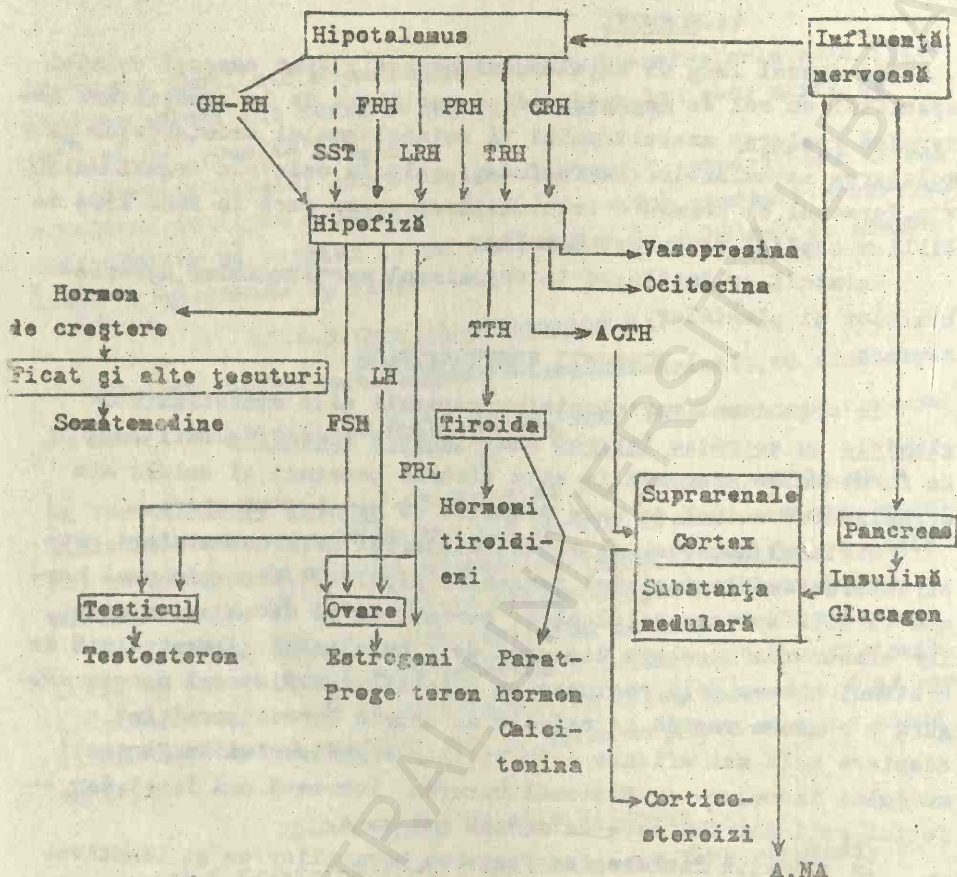


Fig.14.1Schema simplificată a structurii ierarhice a sistemului hormonal.

unui tip de celule sau chiar asupra cîtorva tipuri(efect pleiotropic).Pe de altă parte,există celule cu cîteva tipuri de receptori,care pot reacţiona la diferite semnale.

Hormonii vertebratelor aparţin la clase diferite de substanţe.Se disting :1)hormoni derivaţi din aminoacizi; 2)hormoni peptidici; 3)hormoni steroidici şi 4) hormoni cu altă structură.

Hormonii peptidici sînt produşi primari ai genelor.Determinarea secvenţei aminoacizilor în moleculele hormonilor peptidici dovedeşte un conservatism extrem al acestoraîn cursul evoluţiei

şi indică raporturi de înrudire între ei. Aceste rezultate sînt importante, între altele, pentru că ele permit să se prevadă în ce măsură diferite preparate hormonale pot să stimuleze sistemul imun. In cazul unor deosebiri prea mari între hormonii omologi ai donorului şi primitorului, terapia hormonală este sortită eşecului datorită reacţiei imune a organismului.

Mulţi hormoni peptidici se formează sub formă de predecesori inactivi, număţi <u>prehormoni</u>, care se transformă în forma activă prin proteoliză limitată. In unele cazuri, precursorul se scindează în doi hormoni diferiţi.

Intrucît hormonii se obţin din organele animale ar a căror resurse sînt limitate, savanţii şi-au orientat atenţia spre ingineria genetică pentru obţinerea hormonilor peptidici cu ajutorul bacteriilor.

14.1.1. <u>Mecanismele interacţiunii hormonilor cu celulele</u>

Deşi hormonii şi capacitatea lor de a modula procesele metabolice în celulele-ţintă se cunosc de mult timp, mecanismul molecular de interacţiune a acestor „mesageri chimici" cu structurile celulare, conducînd în final la realizarea efectului hormonal specific, a putut fi explicat graţie succeselor înregistrate de biochimie şi biologia moleculară în ultimii ani.

După particularităţile mecanismelor de interacţiune a celulelor cu hormonii, ultimii pot fi împărţiţi în două tipuri principale. Hormonii de primul tip pătrund relativ uşor prin membranele plasmatice în celulă şi apoi acţionează în mod specific asupra expresiei genelor. Aparţin primului tip hormonii steroidici şi hormonii tiroidieni. Hormonii de al doilea tip pătrund greu în interiorul celulei. De aceea ei acţionează de la suprafaţa celulei şi de la început necesită un <u>mediator intracelular</u> capabil să realizeze efectele lor. In această categorie se includ hormonii peptidici, catecolaminele, prostaglandinele, kininele, histamina, acetilcolina. Caracteristic pentru aceşti hormoni sînt efectele lor rapide, condiţionate prin activarea enzimelor şi proteinelor preexistente, deja sintetizate.

In concordanţă cu cele două tipuri de hormoni s-au evidenţiat şi două tipuri de receptori hormonali: intracelulari şi mem-

branari.In primul caz receptorul este localizat în interiorul celulei şi condiţionează,cel puţin în primele etape,acţiunea hormonului.In cazul hormonilor de al doilea tip,receptorul se află în membrana plasmatică(pe suprafaţa ei exterioară) şi determină de la început formarea mediatorului care la rîndul lui poate fi recepţionat intracelular.Indiferent de localizarea celulară a receptorilor,aceştia sînt proteine specifice,capabile să formeze cu hormonii complecşi caracteristici.Formarea complexului hormon-receptor este în timp primul act,relativ autonom,al interacţiunii selective a hormonului cu celulă.

Conform concepţiei generale admise în prezent interacţiunea hormonilor steroidici cu celula se compune din următoarele etape:
1.Hormonul steroidic liberat de proteinele transportoare serice, este capabil să pătrundă în interiorul celulei-ţintă şi în citosolul ei se leagă repede cu receptorul specific.
2.Complexul hormon-receptor format suferă o transformare structurală şi dobîndeşte capacitatea de a pătrunde în nucleu.
3.In nucleu,complexul activat interacţionează cu anumite situsuri acceptoare ale cromatinei şi iniţiază dezvoltarea efectelor hormonale specifice,modulînd procesul de transcriere.
4.Ciclul interacţiunii se încheie cu scindarea sau dislocarea complexului din cromatină prin intermediul unui mecanism de decuplare.

Spre deosebire de receptorii hormonilor steroidici,partea dominantă a receptorilor triiodotironinei şi tiroxinei este localizată în cromatina nucleului,iar restul în citosol şi mitocondrii.

Interacţiunea hormonilor peptidici şi catecolaminelor cu celulele-ţintă poate fi rezumată astfel :
1)Formarea complexului specific hormon-receptor pe suprafaţa membranei plasmatice.
2)Transmiterea semnalului de la complexul hormon-receptor la enzima membranară adenilatciclaza hormono-dependentă şi activarea ei.
3)Adenilat-ciclaza stimulată catalizează la suprafaţa internă a membranei plasmatice,în prezenţa Mg^{2+},transformarea ATP în 3',5'-AMP(AMPc) care intervine ca al doilea mesager,realizînd efectele

intracelulare ale hormonilor fixaţi de receptorii de la suprafaţa membranei.
4)AMPc format intracelular interacţionează cu un receptor specific care este subunitatea reglatoare a enzimei proteinkinaza (proteinfosfokinaza) AMPc-dependentă.
5)Activarea subunităţii catalitice a proteinkinazei de către complexul AMPc-receptor.
6)Subunitatea catalitică activată realizează în citoplasmă fosforilarea unor enzime şi proteine deja sintetizate care favorizează diferite procese.
7)Inactivarea hormonului,AMPc şi/sau receptorului.

S-a stabilit că adenilatciclaza hormono-dependentă reprezintă probabil o enzimă unică,asupra căreia se extinde acţiunea diverşilor hormoni,în timp ce receptorii hormonali sînt multipli şi specifici pentru fiecare hormon.Adenilatciclaza a fost descoperită atît la procariote cît şi la eucariote.AMPc se inactivează prin scindarea lui în 5'-AMP,sub acţiunea unei fosfodiesteraze specifice.

In unele ţesuturi rolul de mesager secundar al hormonilor este îndeplinit de GMPc care se formează datorită guanilatciclazei.Cuplarea guanilatciclazei poate fi determinată de prolactină,secretină,acetilcolină etc.

In medierea efectelor celulare ale unor hormoni pot interveni ionii Ca^{2+} care activează sau inhibă o serie de enzime.

In ultimii ani s-a adus dovada efectelor intracelulare directe pentru majoritatea hormonilor peptidici.

14.1.2.Hormoni derivaţi din aminoacizi

14.1.2.1.Hormonii glandei tiroide

Principalii hormoni tiroidieni sînt 3,5,3'-triiodotironina (T_3) şi 3,5,3',5'-tetraiodotironina(T_4) sau tiroxina,care se găsesc în glanda tiroidă sub forma unui complex cu glicoproteina iodată,numită tireoglobulină(masa moleculară : 660.000 D).Glanda tiroidă este bogată în ioni de iodură pe care îi captează activ şi repede din sînge.Sub acţiunea unei peroxidaze speciale are loc oxidarea iodurilor anorganice la iod molecular($2I^- - 2e \longrightarrow I_2$). Probabil,această peroxidază realizează,de asemenea,încorporarea

enzimatică a iodului elementar în radicalii de tirozină din molecula tiroglobulinei, rezultînd 3-monoiodotirozina(MIT) şi 3,5-diiodotirozina(DIT), care servesc drept precursori în sinteza hormonilor tireoidieni(fig.14.2). Condensarea radicalului de MIT cu radicalul de DIT conduce la formarea triiodotironinei(T_3) în compoziţia tiroglobulinei, iar prin condensarea a doi radicali de DIT se obţine tetraiodotironina(T_4).

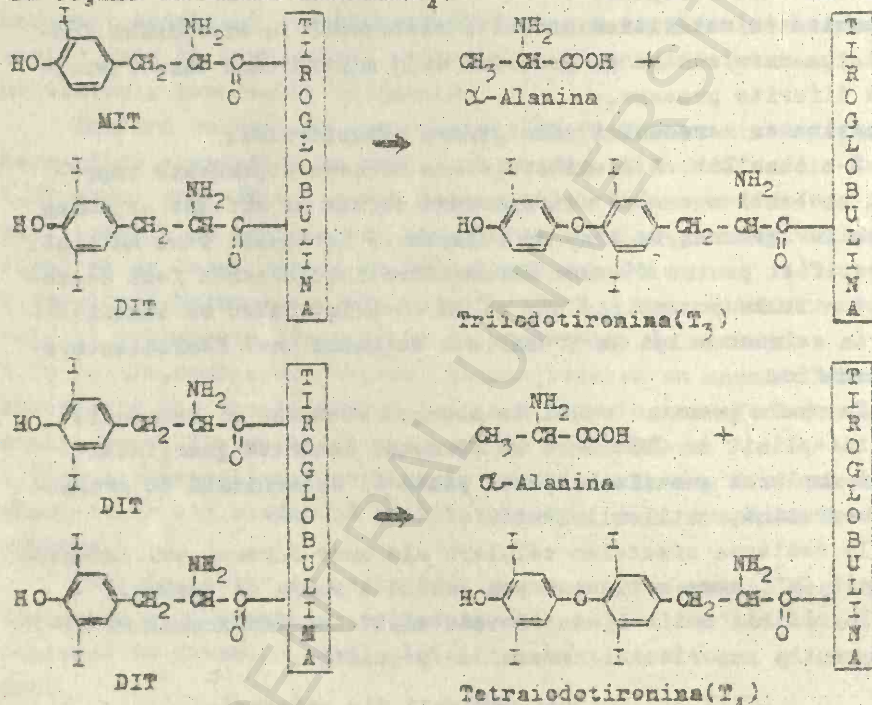


Fig.14.2. Biosinteza iodotironinelor hormonale din radicalii de tirozină iodaţi pe molecula de tiroglobulină.

Mecanismul procesului de condensare încă nu este elucidat. Cantitatea de tiroxină sintetizată este de circa 4 ori mai mare decît cantitatea de T_3 sintetizată.

Scindarea T_3 şi T_4 de la tiroglobulină constituie ultima etapă a biosintezei hormonilor tireoidieni. Eliberarea hormonilor activi are loc prin proteoliza tiroglobulinei sub acţiunea catepsinelor tiroidiene.

Procesul de biosinteză a hormonilor tiroidieni, proteoliza

tiroglobulinei şi eliberarea lor în sînge se află sub controlul hormonului tirotrop(TTH). Hormonii tiroidieni eliberaţi prin proteoliza tiroglobulinei sînt secretaţi în sînge, fiind transportaţi de unele proteine plasmatice(inter-α-globulinele, prealbumina şi albumina) în tot organismul.

Acţiunea biologică a hormonilor tiroidieni asupra organismului animal este multiplă. Ei reglează creşterea şi dezvoltarea organismului, diferenţierea celulelor şi metabolismul substanţelor.

In diferite forme de insuficienţă tiroidiană care apare în copilărie la om, se observă creşterea staturală deficitară şi scăderea vitezei de sinteză a proteinelor. Tiroidectomia mamiferelor şi păsărilor în etapele timpurii ale ontogenezei cauzează o frînare însemnată a creşterii şi proceselor anabolice. Totodată, administrarea hormonilor tiroidieni în insuficienţa glandei tiroide sau căderea funcţiei ei determină revenirea acestor procese la normal. Influenţa profundă a hormonilor tiroidieni asupra dezvoltării organismului este confirmată de imposibilitatea metamorfozei la mormolocii de broască tiroidectomizaţi. După datele actuale, efectul hormonilor tiroidieni asupra proceselor de creştere şi diferenţiere celulară în diferite ţesuturi(ficat, muşchi, piele etc.) ale organismului animal în dezvoltare se corelează cu sistemul de sinteză a proteinelor în celulă. In acest caz, T_3 şi T_4(dar mai ales T_3) interacţionează cu proteinele intranucleare din compoziţia cromatinei şi stimulează sinteza diferitelor tipuri de ARN, care determină şi treptat intensifică biogeneza ribozomilor, sinteza proteinelor structurale şi funcţionale ale mitocondriilor şi microsomilor, formarea membranelor celulare, de asemenea, sinteza ATP.

Acţiunea dozelor fiziologice(10-35 mcg) de T_3 şi T_4 se realizează cu o perioadă latentă mare. Dozele fiziologice ridicate şi toxice(peste 100 mcg) acţionează aproape instantaneu şi probabil, predominant, asupra mitocondriilor.

Una din particularităţile iodotironinelor este capacitatea lor de a intensifica metabolismul bazal, ceea ce se asociază cu ridicarea consumului de O_2 şi generarea de căldură. Influenţa stimulatoare a concentraţiilor fiziologice de T_3 şi T_4 asupra

respiraţiei şi termogenezei nu determină o decuplare elocventă a oxidării şi fosforilării mitocondriale. O explicaţie mult mai plauzibilă a efectului calorigen specific hormonilor tiroidieni se bazează pe scindarea intensă a ATP în procesele energodependente, conducînd la asigurarea reacţiilor în care se utilizează O_2 cu acceptorul fosfatului(ADP). Ca rezultat consumul de oxigen se menţine ridicat.

S-a postulat încă o cale de influenţă a T_3 şi T_4 asupra celulei. Este vorba despre stimularea Na^+,K^+-ATP-azei sub acţiunea iodotironinelor. Se presupune că hormonii tiroidieni activează transportul Na^+ realizat de Na^+,K^+-ATP-aza membranelor plasmatice ale celulei, intensificînd hidroliza ATP, iar secundar fosforilarea conjugată(datorită ADP format) şi producerea de căldură.

Insuficienţa biosintezei de hormoni tiroidieni(hipotiroidismul) se manifestă în copilărie prin cretinism: oprirea dezvoltării fizice şi intelectuale. La adult, hipotiroidismul dă naştere unei boli numite mixedem, în care se observă scăderea metabolismului bazal, edemaţierea pielii, astenie, obezitate şi tulburări neuropsihice. In unele regiuni muntoase, unde solul şi apa conţin cantităţi mici de iod, necesar pentru sinteza iodotironinelor, hipotiroidismul apare sub formă de guşă endemică.

Hiperfuncţia glandei tiroide(hipertiroidismul) se prezintă sub diferite forme, toate avînd în comun încărcarea organismului cu hormoni tiroidieni. Aceştia, depăşind concentraţia fiziologică -limită, determină apariţia unor simptome caracteristice al căror ansamblu se defineşte prin termenul tireotoxicoză. Manifestările tireotoxicozei conţin creşterea metabolismului bazal, pierderea în greutate, nervozitate, emotivitate, nelinişte, palpitaţii etc.

14.1.2.2. Hormonii medulosuprarenalei

In substanţa medulară a suprarenalelor se sintetizează trei derivaţi ai orto-dihidroxibenzenului(catecolului), numiţi catecolamine : adrenalina(A), noradrenalina(NA) şi dihidroxifenil-etilamina(DOP-amina). NA se eliberează în terminaţiile nervilor simpatici, unde îndeplineşte rolul de neuromediator. DOP-amina serveşte ca mediator cu preponderenţă în căile nervoase ale creierului. Adrenalina este secretată în terminaţiile nervoase din

hipotalamus. Proporţia A şi NA în medulosuprarenală variază semnificant la diferite specii de animale.

Calea principală de sinteză a catecolaminelor cuprinde următoarele etape (fig.14.3). Tirozina existentă în celulă sau formată

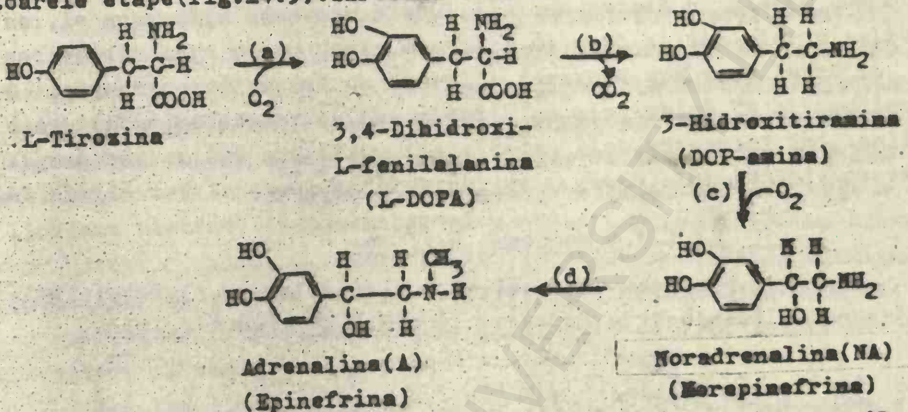


Fig.14.3. Biosinteza catecolaminelor. (a) - Tirozin-hidroxilaza; (b) - DOPA-decarboxilaza; (c) - DOP-amin-β-hidroxilaza; (d) - Feniletanolamin-N-metiltransferaza.

din fenilalanină este hidroxilată în poziţia 3 cu formarea L-3,4-dihidroxifenilalaninei (L-DOPA). Această reacţie, catalizată de tirozin-hidroxilază în prezenţa NADPH, O_2 şi tetrahidrobiopterinei drept cofactor, determină viteza de biosinteză a hormonilor medulosuprarenalei. In stadiul următor al procesului, DOPA-decarboxilaza catalizează decarboxilarea L-DOPA, rezultînd 3-hidroxitiramina (DOP-amina). Sintetizată în citosol, DOP-amina trece mai departe în granulele secretoare ale celulelor cromafine şi simpatergice, unde se transformă prin hidroxilare în NA, sub acţiunea DOP-amin-β-hidroxilazei (Cu^{2+}-oxidază ce necesită acidul ascorbic). O mare cantitate de NA părăseşte granulele noradrenalinice şi după includerea în granulele adrenalinice este convertită cu ajutorul S-adenozilmetioninei la A, reacţia fiind catalizată de feniletanolamin-N-metiltransferază.

Acţiunile biologice ale catecolaminelor sînt diverse. Multe din influenţele A şi NA asupra metabolismului substanţelor sînt condiţionate de interacţiunea cu receptorii de pe suprafaţa exterioară a membranei plasmatice, urmată de stimularea adenilat-

ciclazei membranare a celulelor din organele-ţintă. Adrenalina intensifică glicogenoliza în ficat şi muşchi, ducînd la creşterea cantităţii de glucoză în sînge şi formarea acidului lactic în muşchi.

La om aceste efecte sînt însoţite de mărirea consumului de O_2 şi formării de CO_2. Noradrenalina spre deosebire de adrenalină influenţează slab metabolismul glucidic.

Catecolaminele, de asemenea, stimulează lipoliza, în urma căreia din ţesutul adipos se eliberează acizi graşi liberi şi în sînge creşte nivelul acizilor graşi neesterificaţi.

14.1.2.3. Hormonul epifizei

Hormonul epifizei este melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) care se formează în pinealocite din triptofan (fig.14.4).

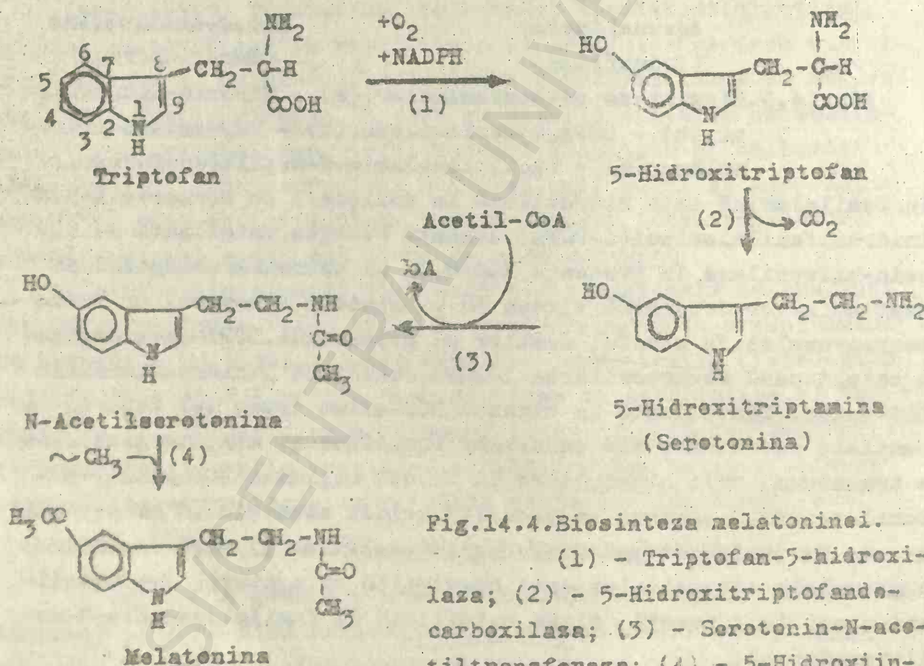


Fig.14.4. Biosinteza melatoninei. (1) - Triptofan-5-hidroxilaza; (2) - 5-Hidroxitriptofandecarboxilaza; (3) - Serotonin-N-acetiltransferaza; (4) - 5-Hidroxiindol-O-metiltransferaza (HIOMT).

Primele trei etape ale acestei biosinteze sînt reglate de adrenalină pe calea stimulării adenilatciclazei. Enzima (4) prezintă un interes deosebit, întrucît cantitatea ei în epifiza mamiferelor se

modifică periodic în 24 de ore(ritm circadian),fiind maximă în intuneric.Lumina stimulează semnalele care ajung în glandă prin fibrele nervoase simpatice şi determină inhibiţia sintezei HIOMT.

Funcţia principală a melatoninei constă în concentrarea melaninelor în melanofori,determinînd decolorarea pielii la amfibieni şi peşti.Alături cu reglarea metabolismului pigmenţilor,melatonina inhibă dezvoltarea funcţiilor sexuale la animalele tinere, de asemenea,acţiunea gonadotropinelor la animalele mature.In plus, melatonina joacă un rol principal în apariţia somnului.

Se presupune că melatonina şi epifiza mediază legătura între radiaţiile luminoase,sistemul nervos şi funcţionalitatea anumitor organe,condiţionînd ritmurile circadiene,adică evoluţia ritmică sau ciclică a diferitelor procese biochimice şi fiziologice la animale,în decurs de 24 ore.

14.1.3-Hormoni peptidici

14.1.3.1.Hormonii neurohipofizei

Neurohipofiza mamiferelor secretă ocitocina(oxitocina),vasopresina şi coherina.Neurohipofiza majorităţii vertebratelor,cu excepţia mamiferelor,produce vasotocină.Toţi aceşti hormoni se formează din polipeptide precursoare numite neurofizine(M = 10.000-12.000).Ultimele,la rîndul lor,rezultă dintr-o proteină (M=20.000) sintetizată în nucleii paraventriculari şi supraoptici ai hipotalamusului.Neurofizinele şi hormonii neurohipofizari se scindează de la precursori mai mari în timpul transportului ultimilor prin axoni din hipotalamus în neurohipofiză.Ca structură chimică ocitocina,vasopresina şi vasotocina sînt peptide alcătuite din nouă aminoacizi şi conţin o legătură disulfidică între resturile de cisteină din poziţiile 1 şi 6(fig.14.5).

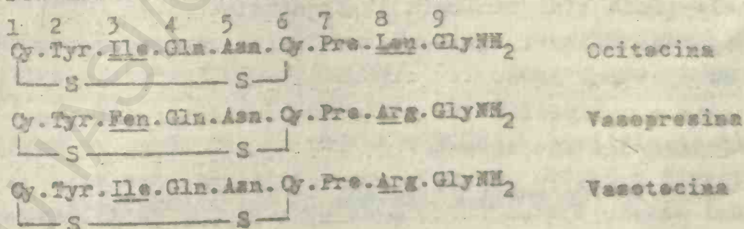


Fig.14.5.Structura primară a principalilor hormoni neurohipofi-

zari.Denumirile vasopresinelor se fac după natura radicalului de aminoacid din poziţia 8 : hormonul de la om,bovine şi ovine se numeşte arginin-vasopresină,iar hormonul suinelor - lizin-vasopresină.In toate aceste peptide carboxilul restului de glicocol apare sub formă amidică ($-C\overset{\nearrow O}{\searrow NH_2}$).

Deşi sînt foarte asemănătoare structural,deosebindu-se numai după aminoacizii din poziţiile 3 şi 8,ocitocina şi vasopresina au acţiuni biologice diferite.

Activitatea hormonală principală a ocitocinei constă în stimularea contracţiei muşchilor netezi,în special ai uterului.Ocitocina cauzează,de asemenea,evacuarea laptelui din glanda mamară. O astfel de acţiune are şi vasopresina însă în doze de 5-6 ori mai mari.

Vasopresina reglează presiunea osmotică a sîngelui în principal pe calea intensificării reţinerii apei în organism.La mamifere acest hormon inhibă eliminarea renală a apei,de unde denumirea de hormon antidiuretic.La toate celelalte vertebrate reglarea metabolismului hidric este îndeplinită de vasotocină şi într-un grad mai redus de ocitocină.Locul principal de intervenţie a vasopresinei la mamifere îl constituie nefronul,mai exact tubulii contorţi distali şi tubulii colectori.Acţionînd asupra acestor părţi ale nefronului,vasopresina stimulează selectiv reabsorbţia apei din urina primară în sînge,ceea ce conduce la creşterea concentraţiei Na^+, Cl^-,fosfaţilor şi azotului total în urină.Totodată, în reglarea metabolismului apei de către vasopresină la mamifere este implicată şi acţiunea ei asupra reabsorbţiei apei în mucoasa intestinului şi glandele salivare.La amfibieni hormonii neurohipofizari stimulează reabsorbţia apei din urina conţinută în vezica urinară şi captarea apei de către piele din mediul înconjurător. La peşti organele-ţintă sînt rinichii şi branhiile.

Hormonii neurohipofizari îşi realizează efectele asupra celulelor-ţintă cu ajutorul AMPc.

Coherina este o polipeptidă cu M~4.000 care determină contracţiile coordonate ale intestinului.

14.1.3.2.Hormonii reglatori ai hipotalamusului

Hipotalamusul secretă o serie de peptide micromoleculare

care stimulează sau inhibă secreţia hormonilor de către alte glande endocrine(adenohipofiză).Aceste peptide(tabelul 14.1) se numesc factori reglatori sau hormoni reglatori.In structura lor

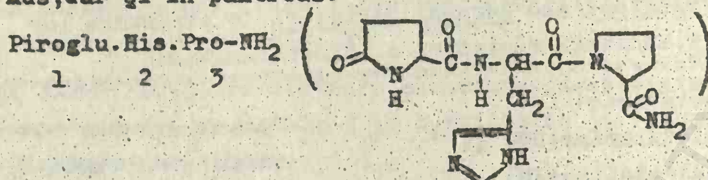
Tabelul 14.1.Hormonii reglatori ai hipotalamusului

Hormoni hipotalamici : Releasing-hormoni=liberine(RH) şi inhibiting-hormoni=statine(IH)	Hormoni a căror secreţie este reglată
Hormonul reglator al corticotropinei, (corticoliberina,CRH)	Adrenocorticotropul (ACTH) sau corticotropina
Hormonul reglator al FSH şi LH (FSH-RH sau FRH şi LH-RH sau LRH)	Hormonul foliculostimulant(FSH),hormonul luteinizant(LH)
Hormonul de stimulare a GH (somatoliberina,GH-RH)	Hormonul de creştere (GH) sau somatotropina
Hormonul de inhibare a GH (somatostatina,GH-IH sau SST)	
Hormonul stimulator al MSH (melanoliberina,MSH-RH sau MRH)	Hormonul melanocitostimulator(MSH) sau melanotropina
Hormonul inhibitor al MSH (melanostatina,MSH-IH sau MIH)	
Hormonul stimulator al prolactinei (prolactoliberina,PRL-RH sau PRH)	Prolactina
Hormonul inhibitor al prolactinei (prolactostatina,PIH)	
Hormonul reglator al TTH (tiroliberina,TTH-RH sau TRH)	Hormonul tirotrop(TTH) sau tirotropina

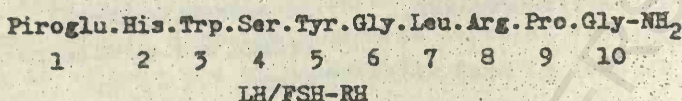
intră un număr mic de resturi de aminoacizi(fig.14.6).

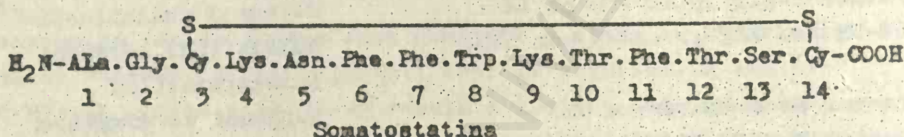
Hormonii reglatori nu totdeauna posedă o direcţie strict specifică de acţiune.Aşa,somatostatina are efecte inhibitoare asupra multor glande endocrine : ea inhibă secreţia GH,secreţia indusă a TTH şi prolactinei,secreţia insulinei şi indeosebi a

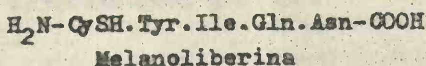
glucagonului,de asemenea a hormonilor tractusului gastro-intestinal.Interesant că somatostatina se formează nu numai în hipotalamus,dar şi în pancreas.



Tiroliberina







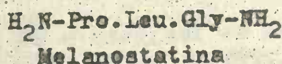


Fig.14.6.Structura primară a unor hormoni reglatori

In prezent s-a realizat sinteza ARNm al somatostatinei şi a genei ei.Gena sintetizată a fost introdusă într-o plasmidă şi cu ajutorul ei s-a creat o nouă sugă de bacterii producătoare de somatostatină.

Sinteza hormonilor hipotalamici,de asemenea,efectul lor reglator asupra secreţiei hormonilor hipofizari se controlează după mecanismul feedback, care poate fi atît pozitiv cît şi negativ.

14.1.3.3.Angiotensine şi kinine

<u>Angiotensinele</u> se formează în sînge şi ţesuturile periferice din prohormonul proteinic,numit <u>angiotensinogen</u>,care rezultă în ficat prin scindarea α_2-globulinelor plasmatice.Enzima proteolitică <u>renina</u> produsă de rinichi eliberează de la angiotensinogen o decapeptidă - <u>angiotensina I</u> (fig.14.7).Sub acţiunea <u>enzimei de convertire</u> se scindează încă doi aminoacizi de la capătul C-terminal al angiotensinei I,rezultînd <u>angiotensina II</u>,cea mai puternică din substanţele naturale cu acţiune presoare.Totodată,angio-

tensina II stimulează sinteza aldosteronului în corticosuprarenală,ceea ce conduce la retenţia de Na^+ în organism,avînd ca urmare creşterea tensiunii arteriale.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
H_2N-Asp.Arg.Val.Tyr.Ile.His.Pro.Phe.His.Leu.Leu.Val.Tyr.Ser.—R
Angiotensinogen,α-glicoproteină (M - 58.000)

↓ Renină,endopeptidază (M - 40.000)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
H_2N-Asp.Arg.Val.Tyr.Ile.His.Pro.Phe.His.Leu-COOH
Angiotensina I (decapeptidă)

↓ Enzima de convertire

1 2 3 4 5 6 7 8
H_2N-Asp.Arg.Val.Tyr.Ile.His.Pro.Phe-COOH
Angiotensina II (octapeptidă)

↓ α-Aminopeptidaza

1 2 3 4 5 6 7
H_2N-Arg.Val.Tyr.Ile.His.Pro.Phe-COOH
Angiotensina III (heptapeptidă)

Fig.14.7.Formarea angiotensinelor din angiotensinogen.

In plasma sanguină şi ţesuturi,mai ales în rinichi,intestin şi ficat se găsesc peptidazele denumite angiotensinaze care inactivează rapid angiotensina II,transformînd-o în diverse peptide, importanţă fiziologică avînd îndeosebi angiotensina III.Descoperită mai de curînd,angiotensina III posedă o afinitate crescută pentru receptorii din corticosuprarenală,acest hormon fiind după unii cercetători principalul activator al secreţiei de aldosteron.

In plasma sanguină şi ţesuturi s-a evidenţiat,de asemenea, prezenţa de substanţe cu acţiune depresoare care au primit numele de kinine.Reprezentanţii cei mai importanţi ai kininelor sînt kallidina şi bradikinina.Ambele aceste peptide se formează prin hidroliza unui precursor comun kininogenul care intră în compoziţia fracţiunii globulinice din plasmă.Această acindare proteolitică poate fi realizată de tripsină,plasmină,enzime proteolitice specifice(kallicreine sau kininogenaze) şi proteinazele din veninul unor şerpi.Kallicreina pancreatică şi renală generează deca-

peptida kallidina(lizilbradikinina),care este transformată de aminopeptidază în bradikinină(fig.14.8).

Kininogen

↓ Kallicreina pancreatică sau renală

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
H_2N-Lys.Arg.Pro.Pro.Gly.Phe.Ser.Pro.Phe.Arg-COOH
Kallidina sau lizilbradikinina(decapeptidă)

↓ Aminopeptidază

1 2 3 4 5 6 7 8 9
H_2N-Arg.Pro.Pro.Gly.Phe.Ser.Pro.Phe.Arg-COOH
Bradikinina(nonapeptidă)

Fig.14.8.Scindarea proteolitică a kininogenului în kinine.

Kallidina,generată de kallicreină renală,determină vasodilatație,natriurie şi poliurie,acţiuni antagoniste celor exercitate de angiotensine şi aldosteron.Cercetări recente au precizat că bradikinina activează eliberarea prostaglandinei E_2(PGE_2) care intervine în realizarea efectelor renale vasodilatatoare şi natriuretice ale sistemului kallicreină-kallidină.

Kininele plasmatice şi tisulare sînt inactivate de kininaza II,identică cu enzima de conversie,precum şi de carboxipeptidaza B.

14.1.3.4.<u>Hormonii adenohipofizei</u>

Adenohipofiza secretă cîţiva hormoni cu acţiune biologică foarte diferită.Dintre aceştia fac parte :

<u>Hormonul tirotrop</u>(TTH),<u>tirostimulina</u>(TSH) sau <u>tirotropina</u> este o glicoproteină (M=28.300) alcătuită din două subunităţi legate necovalent,notate cu α şi β.La fiecare specie de mamifere secvenţa aminoacizilor în subunitatea α a TTH,FSH şi LH este aceeaşi;la om o succesiune analoagă are subunitatea α a gonadotropinei corionice(HCG).Subunităţile β ale acestor hormoni sînt diferite şi ele conferă specificitatea de acţiune.Se presupune că toţi cei patru hormoni au provenit în procesul de evoluţie dintr-un precursor comun.

TTH controlează funcţia glandei tiroide,influenţînd captarea ionilor de iodură din sînge,încorporarea iodului în resturile de

tirozină din molecula tireoglobulinei, sinteza hormonilor tiroidieni şi eliberarea lor din glandă. Acţiunea TTH asupra celulelor tiroidei începe cu fixarea hormonului la receptorii specifici lui, avînd ca rezultat stimularea adenilatciclazei legată cu membrana plasmatică şi creşterea concentraţiei intracelulare a AMPc. In consecinţă se intensifică procesele intracelulare determinate de TTH.

Sinteza şi secreţia TTH se află sub controlul tiroliberinei (TRH). Hormonii tiroidieni inhibă atît eliberarea TRH de către hipotalamus, cît şi acţiunea TRH la nivelul adenohipofizei. TTH se inactivează în sînge, ficat, rinichi şi scoarţa cerebrală. Piroglutamatpeptidaza catalizînd scindarea restului de piroglutamat de la TRH s-a descoperit în rinichi şi ficat.

Hormonul adrenocorticotrop (ACTH), corticotropina sau corticostimulina reprezintă o polipeptidă din 39 aminoacizi (M=4.500). In structurile ACTH din hipofiza de om, suine, ovine şi bovine primele 24 resturi de aminoacizi sînt identice (fig.14.9). Fragmentul 25-33 diferă la speciile de animale studiate şi condiţionează, probabil, reacţiile imune observate după introducerea preparatelor de ACTH.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
H_2N-Ser.Tyr.Ser.Met.Glu.His.Phe.Arg.Trp.Gly.Lys.Pro.Val.Gly.

24 23 22 21 20 19 18 17 16 15
Pro.Tyr.Val.Lys.Val.Pro.Arg.Arg.Lys.Lys.

25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36
Om -Asp.Ala.Gly.Glu.Asp.Glu.Ser.Ala.Glu.Ala.Phe.Pro.

Suine -Asp.Gly.Ala.Glu.Asp.Glu.Leu.Ala.

Ovine -Ala.Gly.Glu.Ala.Ser.Glu.Ala.Ser.

Bovine -Asp.Gly.Glu.Ala.Glu.Asp.Ser.Ala.

Leu 37
Glu 38
Phe-COOH 39

Fig.14.9. Structura primară a ACTH din hipofiza de om, suine, ovine şi bovine.

Acţiunea biologică majoră a ACTH constă în controlul funcţiei corticosuprarenalei. Acţionînd asupra zonelor fasciculată şi reticulată ale corticosuprarenalei, ACTH stimulează proliferarea celulelor corticosuprarenale şi intensifică biosinteza şi secreţia corticosteroizilor, pe calea favorizării procesului de trans-

formare a colesterolului în pregnenolon.Efectul ACTH asupra steroidogenezei se dezvoltă imediat(la 15-20 minute) după legarea hormonului,prin intermediul heptapeptidei 15-21 din molecula sa, de receptorii de pe suprafaţa exterioară a membranei plasmatice a celulelor corticosuprarenale.Complexul ACTH cu receptorul specific activează adenilatciclaza care catalizează trecerea ATP în AMPc.Acest mesager secundar stimulează o proteinkinază care condiţionează fosforilarea şi activarea simultană a mai multor enzime implicate în biosinteza corticosteroizilor.Proteinkinaza activă intensifică acţiunea colesterolesterazei care eliberează precursorul hormonilor steroidici - colesterolul din esterii lui.Totodată,se activează kinaza fosforilazei b,conducînd la creşterea vitezei de fosforoliză a glicogenului,cu formarea glucozo-1-fosfatului,care se transformă în glucozo-6-fosfat.Prin catabolizarea acestui metabolit se acumulează NADPH necesar în diferite etape ale steroidogenezei.

Mai recent s-a pus în evidenţă faptul că ACTH activează şi guanilatciclaza cu formarea GMPc care duce la proliferare celulară corticosuprarenală.

ACTH manifestă şi efecte extracorticosuprarenale :
- efect melanotrop datorit secvenţei 4-10 comune cu melanotropina;
- efect lipolitic ;
- efect de intensificare a gluconeogenezei hepatice şi sintezei proteinice hepatice.

Sinteza şi secreţia ACTH se află sub controlul CRH.De asemenea,concentraţia corticosteroizilor circulanţi influenţează producţia de ACTH printr-un mecanism de feed-back.

Hormonii gonadotropi(gonadotropinele) sînt hormoni cu acţiune asupra gonadelor.Gonadotropinele de origine adenohipofizară sînt :
1) hormonul foliculostimulant=foliculostimulina=gonadotropina A=FSH ;
2) hormonul luteinizant(LH)=luteostimulina=gonadotropina B=hormonul stimulant al ţesutului interstiţial(ICSH) ;
3) prolactina=hormonul mamotrop=hormonul lactotrop=PRL.

La om se formează un al patrulea hormon gonadotrop în placentă,

denumit gonadotropina corionică umană=HCG.

Masa moleculară a celor patru gonadotropine oscilează în jurul valorii de 30.000.FSH,LH şi HCG sînt glicoproteine(conţinînd 7-30% glucide),alcătuite din două subunităţi neidentice,probabil codificate de două gene diferite.Una din subunităţi,notată cu α, mai scurtă,conţine 89-96 radicali de aminoacizi,două resturi de glucide şi prezintă o mică variabilitate a compoziţiei.A doua subunitate β mai lungă,cuprinzînd 113-119 aminoacizi şi 1-4 radicali glucidici,se distinge printr-o diversitate însemnată a compoziţiei.Subunităţile α şi β se leagă între ele necovalent,probabil prin intermediul radicalilor de tirozină.Fiecare subunitate luată separat nu posedă activitate hormonală.Specificitatea biologică şi imunologică a gonadotropinelor menţionate se datoreşte subunităţii β.

Prolactina este o proteină simplă avînd în moleculă 200 resturi de aminoacizi şi trei punţi disulfidice.

Acţiunile biologice ale gonadotropinelor se realizează numai la nivel gonadal.

FSH provoacă la femele maturizarea foliculilor ovarieni şi (împreună cu LH) ovulaţia.La masculi,FSH stimulează spermatogeneza.

LH stimulează la femele sinteza de estrogeni şi progesteron, ovulaţia şi formarea corpului galben,iar la masculi celulele interstiţiale şi androgenogeneza.

Secreţia FSH şi LH este dependentă de FRH şi LRH,precum şi de nivelul hormonilor sexuali respectivi.

Prolactina reglează funcţia glandei mamare.Acest hormon determină instinctul matern la mamifere şi cel de cuib la păsări.

Acţiunea HCG este asemănătoare cu efectul hormonilor adenohipofizari.

In ce priveşte mecanismul de acţiune al gonadotropinelor, FSH,LH şi HCG se leagă de receptorii specifici ai membranelor celulelor-ţintă şi stimulează formarea AMPc şi GMPc.

Hormonul de creştere(GH),hormonul somatotrop(STH) sau somatotropina este o proteină simplă a cărei structură diferă în raport cu specia.Astfel,molecula GH de la bovidee conţine 189 resturi de aminoacizi(M=21.666),GH din hipofiza de maimuţă - 241

resturi de aminoacizi(M=25.400) şi de la om - 191 radicali de aminoacizi(M=21.000).

STH ocupă un loc deosebit în reglarea sistemică a creşterii organismului la toate speciile de vertebrate,cu excepţia cobaiului.Una din acţiunile principale ale STH este stimularea creşterii armonioase a scheletului şi organelor interne.

In organismul tînăr al vertebratelor cele mai sensibile la acţiunea STH sînt cartilajele de creştere.STH intensifică procesele proliferative în cartilaje şi sinteza unor proteine structurale(colagen) şi mucopolizaharide(condroitinsulfat) specifice acestui ţesut .Totodată,STH determină proliferarea fibroblaştilor. In plus,STH este un stimulator al sintezei proteinelor în ficat, rinichi,splină atît la animalele în creştere,cît şi la cele mature.Insă în organismul matur funcţiile de creştere ale STH se diminuează într-o măsură însemnată,iar efectele anabolice,care se păstrează aproape integral,îndeplinesc un rol important în reglarea metabolismului proteinic al diferitelor celule.Acţiunea reglatoare a STH asupra creşterii şi anabolismului proteinic se realizează prin cîteva mecanisme moleculare care nu sînt identice pentru toate ţesuturile.Intre mecanismele iniţiale care condiţionează influenţa stimulatoare a STH asupra biosintezei proteinice la nivelul muşchiului se include accelerarea transportului de aminoacizi şi glucoză prin membranele plasmatice ale celulelor musculare.

O latură importantă a acţiunii STH asupra ficatului vizează stimularea specifică a producerii de către celulele hepatice a unor factori hormonali „secundari" numiţi somatomedine.Aceste substanţe mediază multe efecte ale STH,în particular,efectele lui asupra creşterii ţesutului osos-cartilaginos.

Rolul fiziologic al STH nu se limitează la intervenţia lui în procesele de creştere şi anabolice.Acest hormon,de asemenea, participă activ în reglarea metabolismului glucidic,lipidic,fosfocalcic şi hidroelectrolitic.STH stimulează gliconeogeneza în ficat şi lipoliza în ţesutul adipos,creşte reabsorbţia tubulară de fosfor şi absorbţia intestinală de calciu(şi excreţia sa renală).

Secreţia STH de către adenohipofiză este stimulată de

somatoliberină şi inhibată de somatostatină.La majoritatea speciilor(cu excepţia şoarecilor) secreţia somatoliberinei şi a STH se intensifică,iar eliberarea somatostatinei se diminuează,sub acţiunea diferiţilor factori ai mediului exterior(efort muscular,traume,frig etc.).Probabil,această reacţie joacă un rol important în sindromul de adaptare la diferiţi excitanţi.

Excesul de STH în perioada copilăriei sau adolescenţei cauzează gigantismul.Hipersecreţia STH în organismul omului adult conduce la acromegalie,caracterizată prin modificări faciale,hipertrofia mîinilor şi picioarelor etc.Insuficienţa secretorie,totală sau parţială,de STH în perioada de creştere este asociată cu nanismul hipofizar(microsomia pituitară) care se manifestă prin stagnarea creşterii,infantilism sexual etc.

Lipotropine.Din extractele hipofizare au fost izolaţi doi hormoni numiţi α- şi β-lipotropine.Aceşti hormoni influenţează metabolismul lipidic,cauzînd lipoliza şi mobilizarea acizilor graşi.Un interes deosebit prezintă β-lipotropina(β-LPH),întrucît ea serveşte,probabil,ca precursor al altor hormoni peptidici.Molecula β-LPH este alcătuită din 90-93 aminoacizi şi are M=10.000 daltoni.S-a constatat că în structura primară a β-LPH,spre capătul ei C-terminal,sînt localizate fragmente a căror secvenţe de aminoacizi corespund peptidelor morfinomimetice,numite enkefaline şi endorfine(fig.14.10).

β-LPH intactă nu posedă activitate opioid-like. Cercetări mai recente au arătat că,la rîndul ei,β-LPH şi ACTH iau naştere dintr-un precursor comun,numit proopicortină,cu masa moleculară de 30 mii daltoni şi care se formează în lobul intermediar al hipofizei.

14.1.3.5.Hormonul melanotrop

Hormonul melanotrop(hormonul melanocitostimulator sau melanotropina=MSH) se sintetizează în lobul intermediar al hipofizei, care este foarte dezvoltat la animalele inferioare.La speciile de animale lipsite de acest lob hipofizar(de exemplu,găini,cobai,cetacee) MSH se descoperă în extractele de adenohipofiză.

Ca structură chimică,MSH este o polipeptidă termostabilă.Se cunosc două polipeptide cu activitate melanocitostimulatoare,nu-

mite α- şi β-MSH.Hormonul α-MSH izolat din hipofiza de maimuţă, cal,bovidee,suine,oaie şi cămilă,are aceeaşi structură,conţinînd 13 aminoacizi.Secvenţa şi numărul aminoacizilor în molecula β-MSH nu sînt identice la diferite specii.β-MSH de la maimuţă,cal,bovidee,suine şi cămilă,conţine 18 resturi de aminoacizi,iar hormonul uman - 22 aminoacizi.Interesant de subliniat că α-MSH intră în compoziţia ACTH(resturile 1-13,fig.14.9),iar β-MSH - în compoziţia moleculei de β-lipotropină(resturile 41-58,fig.14.10).Comparînd structurile primare ale acestor 4 hormoni se constată identitatea deplină a zonei 4-10 în α-MSH şi 7-13 în β-MSH cu fragmentul 4-10 în ACTH şi 47-53 în β-LPH,ceea ce explică activitatea melanotropă slabă a ACTH şi β-lipotropinei.

MSH are rolul fiziologic de a regla pigmentaţia pielii peştilor,amfibienilor şi reptilelor,cauzînd dispersia uniformă sau concentrarea pigmentului în cromatofori.In primul caz,culoarea pielii devine mai închisă,în ultimul mai deschisă.

Secreţia MSH de către hipofiză este controlată de melanoliberină şi melanostatină.

14.1.3.6.Hormonii glandelor paratiroide

Glandele paratiroide secretă doi hormoni:parathormonul şi calcitonina.Aceşti hormoni,împreună cu 1,25-dihidroxi-D_3,intervin în reglarea homeostatică a metabolismului calciului şi fosforului.

Parathormonul sau paratirinul(PTH) reprezintă o polipeptidă monocatenară alcătuită din 84 resturi de aminoacizi,cu M=9.500 D şi este secretat de celulele principale ale paratiroidelor.In compoziţia aminoacidică a PTH nu intră cisteina şi cistina.PTH diferitelor specii de animale prezintă diferenţe neînsemnate ale structurii primare.Fragmentul N-terminal 1-34 este răspunzător de activitatea biologică a hormonului.

In paratiroide PTH se formează prin acţiunea endopeptidazelor lizozomale asupra unui prohormon,în structura căruia la capătul N-terminal se află o hexapeptidă suplimentară.Sinteza PTH este reglată de concentraţia Ca ionic în serul sanguin şi alţi factori;viteza de sinteză a hormonului este invers proporţională cu $[Ca^{2+}]$.

Rolul biologic principal al PTH este cel de menţinere con-

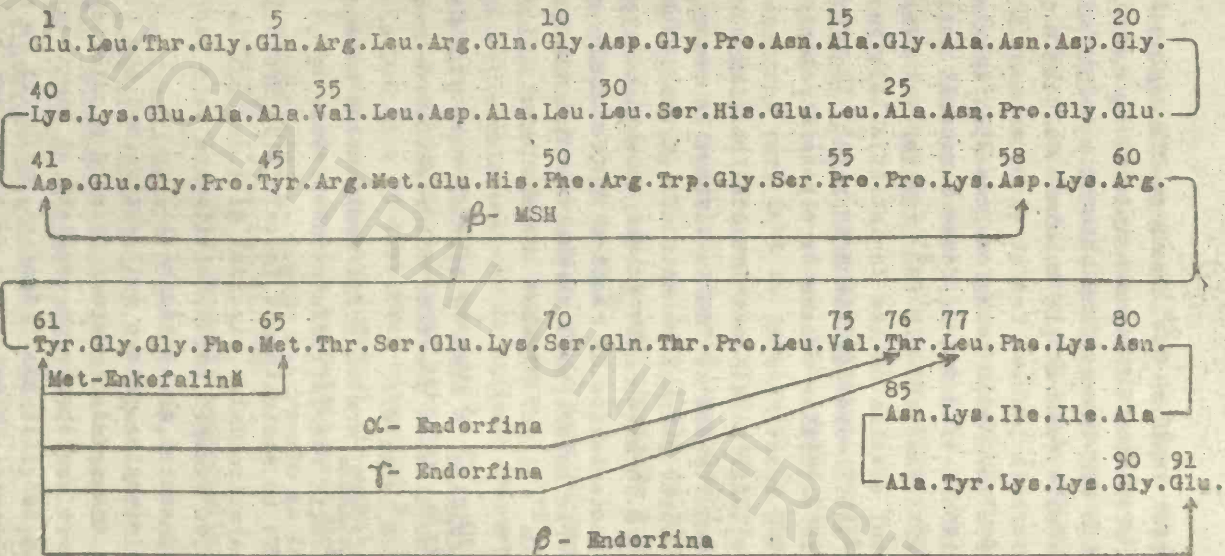


Fig.14.10.Structura primară a β-lipotropinei umane şi a peptidelor biologic active indicate.

stantă a concentrației ionilor Ca^{2+} în sînge.PTH reglează calcemia ca rezultat al efectelor lui asupra intestinului,rinichiului și osului.In intestin PTH intensifică absorbția calciului în sînge.In rinichi PTH crește reabsorbția tubulară de calciu și magneziu și inhibă reabsorbția ionilor fosfat și bicarbonat în tubul proximal.Totodată PTH activează transformarea 25-hidroxi-vitaminei D_3 în 1,25-dihidroxi-vitamina D_3,formă hormonală activă a vitaminei D_3,care mobilizează efectiv Ca^{2+} din țesutul osos și accelerează transportul acestui cation în intestin.La nivelul osului,PTH stimulează mobilizarea și eliberarea Ca^{2+} în sînge,acționînd asupra tuturor celulelor osoase care posedă receptori cu mare afinitate pentru acest hormon.

Mecanismele acțiunii multiple a PTH sînt parțial elucidate. Există date care demonstrează că PTH se fixează la receptorii specifici ai membranelor plasmatice celulare și activează adenilatciclaza membranară.Formarea AMPc în celulele-țintă condiționează procesele caracteristice de răspuns în țesuturile respective,ducînd la creșterea selectivă a permeabilității membranelor plasmatice pentru Ca^{2+} și favorizarea transportului lui din celule în sînge.

In hipoparatiroidism se observă hipocalcemie și hiperfosfatemie,crește excitabilitatea nervilor motori,avînd ca rezultat sindromul complex al tetaniei.

Hiperparatiroidismul are ca primă manifestare hipercalcemie, asociată cu complicații renale,leziune osoasă etc.

Calcitonina(CT) se sintetizează în celulele parafoliculare (celulele C) ale paratiroidelor,tiroidei și timusului.La vertebratele inferioare,de exemplu,pești,calcitonina este secretată de asemenea de corpusculii ultimobranhiali.

Structural calcitonina este o polipeptidă(M=3.600 D).conținînd 32 aminoacizi.Comparînd structura primară a calcitoninei de la diferite specii de vertebrate se constată că numai aminoacizii din pozițiile 1,3-9,28 și 32 sînt identici.Radicalii de aminoacizi din celelalte poziții ale moleculei de hormon pot fi diferiți. Cu toate acestea activitatea biologică a CT este aproximativ aceeași.Un interes deosebit prezintă CT de somon care are o acti-

vitate biologică pentru mamifere de circa 40 de ori mai mare decît CT umană şi de suine. Asemenea situaţie se întîlneşte rar în endocrinologie: de obicei hormonul animalelor aflate pe o treaptă evolutivă mai inferioară este mai puţin eficient la animalele superioare.

Conform cercetărilor recente calcitonina se formează prin proteoliza unui precursor care conţine şi un al doilea hormon hipocalcemiant - katacalcina, cu efect direct, dar şi de potenţare a calcitoninei.

Acţiunea biologică a calcitoninei constă, la fel ca şi a PTH, în reglarea $[Ca^{2+}]$ în sînge. Calcitonina cauzează hipocalcemie prin mecanisme care încă se cercetează. In realizarea funcţiei sale, CT inhibă eliberarea calciului din oase şi intensifică depunerea în ele a calciului mineral; stimulează excreţia fosfaţilor, Ca^{2+}, Na^{+} şi K^{+} pe cale renală. Efectele calcitoninei asupra metabolismului calciului sînt condiţionate de inhibarea permeabilităţii membranelor faţă de Ca^{2+}.

Calcitonina, asemănător PTH, creşte concentraţia AMPc în celulele osoase sensibile la acţiunea ei.

Secreţia calcitoninei se schimbă proporţional cu $[Ca^{2+}]$ în sînge. Creşterea nivelului ionilor de Ca^{2+} în sînge stimulează printr-un mecanism de feedback secreţia calcitoninei şi inhibă secreţia PTH şi 1,25-dihidroxi-vitaminei D_3. Invers, scăderea $[Ca^{2+}]$ în sînge activează secreţia PTH şi sinteza 1,25-dihidroxi-vitaminei D_3 şi scade secreţia de calcitonină. Modificările în secreţia de calcitonină se produc mai repede şi într-un timp mai scurt decît cele ale secreţiei de PTH.

14.1.3.7. Hormonii pancreasului

Pancreasul este o glandă mixtă, care alături de secreţia exocrină necesară în procesele de digestie, are şi secreţie endocrină. Celulele beta(60%) dispuse în zona centrală a insulelor Langerhans secretă insulina, celulele alfa(25%) localizate la periferia insulelor sintetizează glucagonul, celulele delta(10%), răspîndite printre celulele beta, produc somatostatina, iar restul de celule, numite celule F eliberează polipeptida pancreatică, a cărui rol nu este încă elucidat.

Insulina. In tratatele de specialitate, izolarea insulinei este atribuită canadienilor F.G.Banting, C.H.Best şi MacLeod(1922). De fapt, prioritatea aparţine lui N.Paulescu care a publicat rezultatul cercetărilor sale în august 1921, deci înaintea apariţiei publicaţiei canadiene. Acordarea premiului Nobel cercetătorilor canadieni, în 1922, apare ca o dureroasă frustare a ilustrului fiziolog român.

Insulina este o proteină care conţine 51 resturi de aminoacizi(M=6.000) şi are molecula formată din două lanţuri polipeptidice: lanţul A cu 21 de aminoacizi şi lanţul B cu 30 de aminoacizi. Cele două lanţuri se leagă între ele prin două punţi disulfidice între aminoacizii 7-7 şi 19-20, lanţul A avînd o punte disulfidică proprie între radicalii de aminoacizi 6 şi 11(fig.14.11).

Insulina este sintetizată în polizomii celulelor beta sub formă de preproinsulină(preinsulină), proteină constituită dintr-un singur lanţ polipeptidic, cuprinzînd 104-110 resturi de aminoacizi(M=11.500). In timpul migrării din cisternele reticulului endoplasmatic rugos spre aparatul Golgi, preproinsulina pierde o peptidă din 23 aminoacizi de la capătul N-terminal şi se transformă în proinsulină - polipeptidă formată dintr-un singur lanţ cu 81-86 resturi de aminoacizi şi M=9.500. In granulele secretoare proinsulina, lipsită de activitate biologică, este clivată sub acţiunea endopeptidazelor în insulină, peptida de conexiune C, trei molecule de arginină şi una de lizină(fig.14.11). Ulterior, insulina şi peptida C se elimină concomitent, în cantităţi echimoleculare, din granulele secretoare mature la nivelul membranei plasmatice pe calea unui proces energo- şi Ca^{2+}-dependent(emiocitoză sau exocitoză), în urma căruia cele două substanţe trec în circulaţia portală. In serul normal se descoperă cantităţi mici de proinsulină(~6%). Conţinutul de proinsulină, de asemenea, de insulină, creşte puternic la subiecţii cu insulinoame.

Proinsulinele diferitelor specii de vertebrate conţin de la 78(cîine) la 86 resturi de aminoacizi(om, cal, şoarece). Aceste diferenţe se datoresc numai peptidei C. De altfel, structurile primare ale peptidelor C prezintă variaţii mai mari decît structurile insulinelor corespunzătoare.

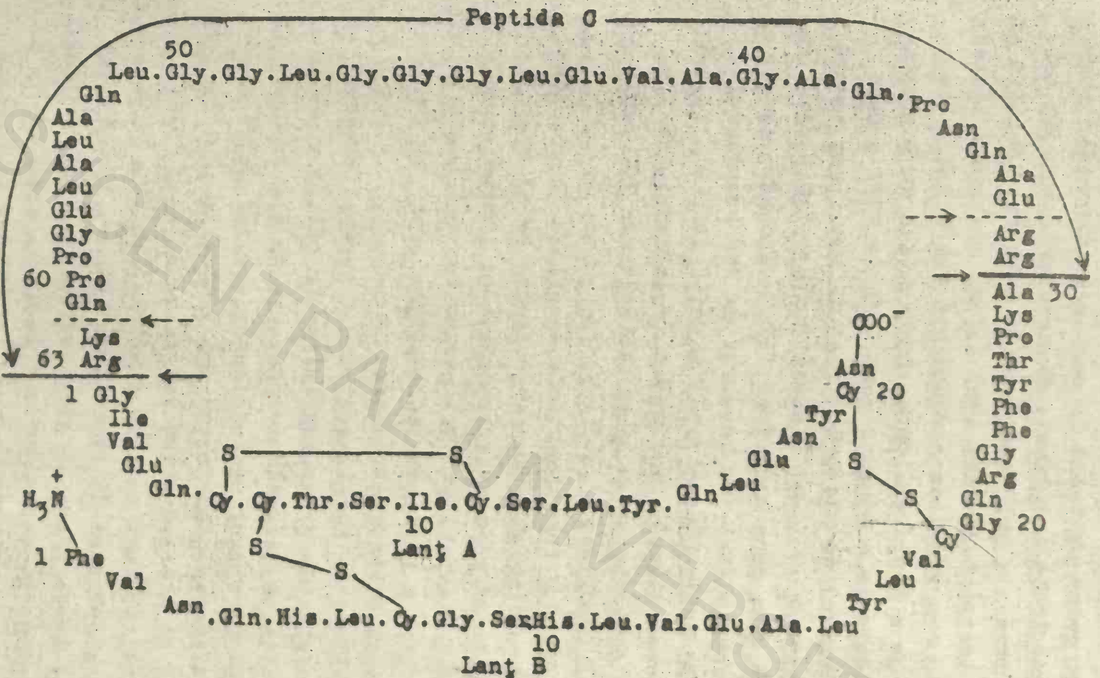


Fig.14.11.Structura primarǎ a proinsulinei de suine.

Cu sǎgeţi continue se indicǎ locul atacului proteolitic iniţial în urma cǎruia,prin scindarea peptidei C,proinsulina se transformǎ în insulinǎ. Proteoliza ulterioarǎ(sǎgeţi punctate) conduce la îndepǎrtarea celor douǎ resturi de Arg de la capǎtul N-terminal şi resturilor de Arg şi Lys de la capǎtul C-terminal al peptidei C.

Insulina a fost prima proteină la care s-a determinat structura primară(F.Sanger,1953).Insulinele diverselor specii de animale se deosebesc între ele prin aminoacizii 8-10 din lanţul A şi aminoacidul 30 din lanţul B.In anul 1965 a fost realizată sinteza chimică a insulinei - o grupă de cercetători din R.F.G.,alta americano-canadiană şi a treia din China.Lanţurile A şi B ale insulinei sînt codificate de o singură genă,care în 1977 a fost clonată în E.coli.Punctul de plecare a fost un insulinom,tumoră pancreatică care secretă un nivel ridicat de insulină.Această tumoră este bogată în ARNm care codifică sinteza proinsulinei.Cu ajutorul revers-transcriptazei s-a preparat un ADN complementar (ADNc) folosind ARNm proinsulinei drept matriţă.ADNc s-a inserat într-o plasmidă-vector.Clonele bacteriene transformate cu ADNc pentru insulină au capacitatea de a sintetiza(circa 100 copii per celulă) precursorul insulinei.

Acţiunea biologică a insulinei este esenţială în reglarea metabolismului intermediar al glucidelor,lipidelor şi proteinelor.Insulina accelerează procesele anabolice şi inhibă pe cele catabolice în muşchi,ficat şi ţesutul adipos.Concret,acest hormon creşte rata de sinteză a glicogenului,acizilor graşi şi proteinelor şi,de asemenea,stimulează glicoliza.

Acţiunea insulinei se realizează prin creşterea penetraţiei glucozei,altor monoglucide şi aminoacizilor în celulele musculare şi adipoase.Astfel,se asigură concentraţia de glucoză necesară pentru glicoliză şi ciclul pentozofosfaţilor.Intensificarea glicolizei,prin activarea hexokinazei sub influenţa insulinei,în muşchii scheletici şi miocard joacă rol în acumularea ATP şi condiţionarea capacităţii funcţionale a acestor ţesuturi.In ţesutul adipos stimularea glicolizei de către insulină are însemnătate pentru formarea de acizi graşi şi glicerolfosfat,a căror abundenţă favorizează sinteza şi depozitarea triacilglicerolilor.In ficat,dar mai ales în ţesutul adipos,insulina creşte lipogeneza din glucoză,accelerînd ciclul pentozofosfaţilor la nivelul glucozo-6-fosfat dehidrogenazei.Totodată insulina manifestă un efect stimulator asupra glicogenogenezei,determinînd trecerea formei D inactive a glicogensintetazei în forma I activă.

Insulina inhibă în acelaşi timp lipoliza şi glicogenoliza(opunîndu-se trecerii fosforilazei b în fosforilază a),precum şi gluconeogeneza prin diminuarea activităţii fosfoenolpiruvat carboxilazei şi fructozo-1,6-difosfatazei.

Toate aceste efecte conduc la scăderea cantităţii de glucoză în sînge(hipoglicemie),de unde şi denumirea de hormon hipoglicemiant dată insulinei.

Unele din efectele rapide ale insulinei,ca de exemplu activarea transportului aminoacizilor şi glucozei se explică prin interacţiunea hormonului cu receptorii din membrana plasmatică.Mesagerii intracelulari în acţiunea insulinei încă nu sînt identificaţi.

Secreţia insulinei se află sub control complex,metabolic şi hormonal.Cînd glicemia depăşeşte limitele homeostatice se declanşează secreţia de insulină.Glucagonul,hormonii gastrointestinali, somatotropina etc. cresc eliberarea insulinei,iar somatostatina este un factor inhibitor.

Lipsa sau insuficienţa de insulină în organismul animal cauzează diabetul zaharat(diabetes mellitus).Acesta este o maladie metabolică ce se caracterizează prntr-un nivel crescut de glucoză în sînge şi urină.Glucoza trece în urină cînd glicemia excede capacitatea de reabsorbţie a tubulilor renali.Hiperglicemia şi glicozuria antrenează diureza osmotică şi poliuria cu pierderi de apă şi electroliţi.Excreţia glucozei determină consumul glucidelor de rezervă,ceea ce conduce la catabolizarea triacilglicerolilor şi proteinelor.Mobilizarea triacilglicerolilor este asociată cu formarea unei cantităţi largi de acetil-CoA.In utilizarea ineficientă a glucozei datorită insuficienţei de acid oxalilacetic,acetil-CoA nu se poate metaboliza în ciclul acidului citric şi este convertită de ficat în corpi cetonici.Eliminarea corpilor cetonici modifică echilibrul acido-bazic şi provoacă dehidratarea,care poate duce la comă sau moarte în faza acută a diabetului netratat.

Hipersecreţia insulinică(hiperinsulinismul) are drept consecinţă hipoglicemia.In această stare la om se observă transpiraţii, tremurături,tulburări vizuale,anxietate,convulsii,neuropatii şi psihoze,comă.

Glucagonul este o polipeptidă formată din 29 aminoacizi(M= 3.485 D) ce se sintetizează în celulele α ale pancreasului,precum şi în tractul digestiv.Există indicaţii că glucagonul,de asemenea, s-ar forma dintr-un precursor.Structura glucagonului este identică sau apropiată la reprezentanţii majorităţii claselor de vertebrate.Numai glucagonul peştilor se deosebeşte de hormonul altor clase şi este ineficient la mamifere.

Glucagonul îndeplineşte un rol important în reglarea metabolismului glucidic şi lipidic,în special la nivel hepatic.Acţiunea glucagonului este opusă insulinei.El creşte şi menţine valoarea glicemiei prin stimularea glicogenolizei şi inhibarea glicogenogenezei.Efectele glucagonului asupra enzimelor implicate în metabolismul glicogenului sînt mediate de sistemul adenilatciclazei. In acelaşi timp,glucagonul favorizează gluconeogeneza,intensificînd sinteza enzimelor-cheie ale acestui proces,tot prin intermediul AMPc.Glucagonul,de asemenea,inhibă sinteza acizilor graşi şi colesterolului din acetat şi stimulează producerea de corpi cetonici.Toate aceste acţiuni ale glucagonului au ca rezultat o creştere marcantă a cantităţii de glucoză eliberată din ficat.

Secreţia glucagonului este activată de hipoglicemie şi inhibată de insulină şi somatostatină(în dependenţă de Ca^{2+} intracelular).

14.1.3.8.Hormonii gastrointestinali

Hormonii gastrointestinali sînt polipeptide(17-43 aminoacizi) secretate de celulele endocrine ale tractului gastrointestinal şi au rol în reglarea procesului de nutriţie(tabelul 14.2).De notat că mulţi din hormonii gastrointestinali au fost decelaţi şi în sistemul nervos central,însă rolul lor nu a fost clarificat pînă în prezent.

14.1.3.9.Peptide opioide endogene : enkefaline şi endorfine

Termenul de peptide opioide endogene desemnează un grup de peptide endogene care au fost identificate în neuronii creierului şi sînt dotate cu potenţialităţi analgezice superioare morfinei. Acestor peptide li s-a atribuit denumirea generală de endorfine

Tabelul 14.2. Date privind structura, sediul şi rolul unor hormoni gastrointestinali

Hormon	Structura	Sediul	Rol fiziologic
Gastrina	17 aminoacizi (M=2100 D)	Celulele antrale	Stimulează secreţia acidă gastrică şi motilitatea gastrică
Secretina	27 aminoacizi (M=3.700 D)	Celulele S duodenale şi jejunale	Stimulează secreţia alcalină a sucului pancreatic
Colecistokinina (Pancreozimina)	33 aminoacizi	Celulele I duodenale şi jejunale	Stimulează eliberarea enzimelor pancreatice, în special a tripsinei şi contracţia veziciii biliare
Bombesina	14 aminoacizi	Celulele H (fundice)	Creşte secreţia exocrină a pancreasului (amilaza) şi motilitatea intestinală
Peptidă inhibitoare gastrică (GIP) = peptidă insulinotropă glucoze-dependentă	43 aminoacizi	Celulele K duodenale şi jejunale	Stimulează eliberarea insulinei postprandiale anticipat creşterii glicemiei
Peptidă intestinală vasoactivă (VIP)	28 aminoacizi (M=3.381 D)	Tot tubul	La nivel intestinal creşte motilitatea şi produce vasodilataţie
Motilina	22 aminoacizi	Intestinul subţire	Creşte activitatea motorie a tractului gastrointestinal

(„morfine endogene"), întrucît ele sînt capabile să producă efecte asemănătoare cu ale morfinei şi concurează cu aceasta la legarea

de receptorii sistemului nervos central pentru opiacee. Primele peptide opioide endogene au fost izolate din creierul de porc(John Hughes,1975). Ele reprezintă două pentapeptide înrudite, numite metionin-enkefalină(Met-enkefalină) şi leucil-enkefalină(Leu-enkefalină), ce diferă prin aminoacidul C-terminal.

In afară de enkefaline au fost descoperite încă trei peptide mai lungi, cunoscute sub denumirea de α-, β- şi γ-endorfine. La extremitatea N-terminală a celor trei endorfine se află secvenţa Met-enkefalinei. Cum am menţionat deja, Met-enkefalina şi endorfinele se regăsesc în β-lipotropină(fig.14.10). Există indicaţii că hormonii opioidici şi ACTH provin din aceeaşi polipeptidă precursoare cu masa moleculară de 29.000 daltoni, prezentă în lobul intermediar al hipofizei şi denumită preopicortină. Această proteină conţine de asemenea α- şi β-MSH. Deşi secvenţa Met-enkefalinei este conţinută în endorfină, se consideră că enkefalinele au drept precursor o polipeptidă(M=50.000 D) izolată din suprarenale.

Enkefalinele sînt răspîndite în sistemul nervos central şi periferic, iar β-endorfina se găseşte în formaţiunile din jurul axei hipotalamohipofizare.

Rolul fiziologic al endorfinelor ar consta în partisiparea lor ca mediatori chimici ai circuitelor neuronale ce modulează senzaţiile dureroase.

14.1.3.10. Hormonii timusului

In ultimii ani au fost izolaţi cîţiva hormoni din timus, a căror denumire, structură chimică şi acţiune biologică sînt redate în tabelul 14.3. Hormonii timusului sînt implicaţi în reglarea

Tabelul 14.3. Caracteristicile unor hormoni secretaţi de timus

Hormon	Structura chimică	Activitatea biologică
Timozina alfa -1	Polipeptidă(28 aminoacizi, M=3.108)	Induce maturarea celulelor limfocitare precursoare T
Timozina beta-4	Polipeptidă (M=4.952)	Stimulează activitatea celulelor limfocitare precursoare
Timozina alfa-7	Polipeptidă (M=2.000)	Induce activitatea celulelor supresoare
Timosterina	Structură steroidică	Rol de inhibare a răspunsului imun

proceselor imunologice şi funcţiilor specifice îndeplinite de celulele limfoide. In procesul de îmbătrînire scăderea eficacităţii reacţiilor imune decurge paralel cu involuţia timusului şi diminuarea conţinutului de hormoni timici în sînge.

14.1.4. Hormoni steroidici

14.1.4.1. Hormonii corticosuprarenalei

Corticosuprarenala secretă peste 30 de hormoni care aparţin steroizilor şi se numesc <u>corticosteroizi</u>. In condiţii normale corticosuprarenala secretă doar patru corticosteroizi: cortizolul, corticosteronul, 11-deoxicorticosteronul şi aldosteronul (fig.14.12). In afară de corticosteroizii menţionaţi, corticosuprarenala mai produce hormoni gonadali (androgeni, estrogeni şi progesteron).

Drept precursor pentru sinteza hormonilor corticosuprarenali serveşte colesterolul, care prin clivarea catenei laterale între C-20 şi C-22 se transformă în pregnenolon. ACTH stimulează conversia colesterolului în pregnenolon, care constituie punctul de plecare în biosinteza tuturor hormonilor steroidici (fig.14.12). Intensificarea sintezei steroizilor în corticosuprarenală sub influenţa ACTH se realizează prin activarea adenilatciclazei şi formarea ulterioară a AMP ciclic. Ultimul declanşează procesele metabolismului glucidic conducînd la formarea NADPH necesar pentru reacţiile de hidroxilare. Acţiunea ACTH se exercită cu predilecţie asupra biosintezei cortizolului şi corticosteronului. Reglarea secreţiei cortizolului şi corticosteronului, efectuate de ACTH, se află la rîndul său sub controlul corticoliberinei (CRH). Intrucît CRH se sintetizează şi se eliberează în hipotalamus, numeroşi stimuli nespecifici, care acţionează asupra sistemului nervos, pot creşte nivelul corticosteroizilor în sînge. Nivelul circulant al hormonilor corticosuprarenali reglează viteza de secreţie a CRH şi ACTH printr-un mecanism de feedback; această viteză se modifică invers proporţional cu concentraţia corticosteroizilor în sînge.

Reglarea secreţiei aldosteronului doar parţial depinde de ACTH, ea fiind sensibilă la alţi factori. Astfel, secreţia aldosteronului variază în sens invers cu $[Na^+]$ şi direct cu $[K^+]$. Angiotensina II stimulează eliberarea aldosteronului.

Secreţia corticosteroizilor comportă un ritm circadian,

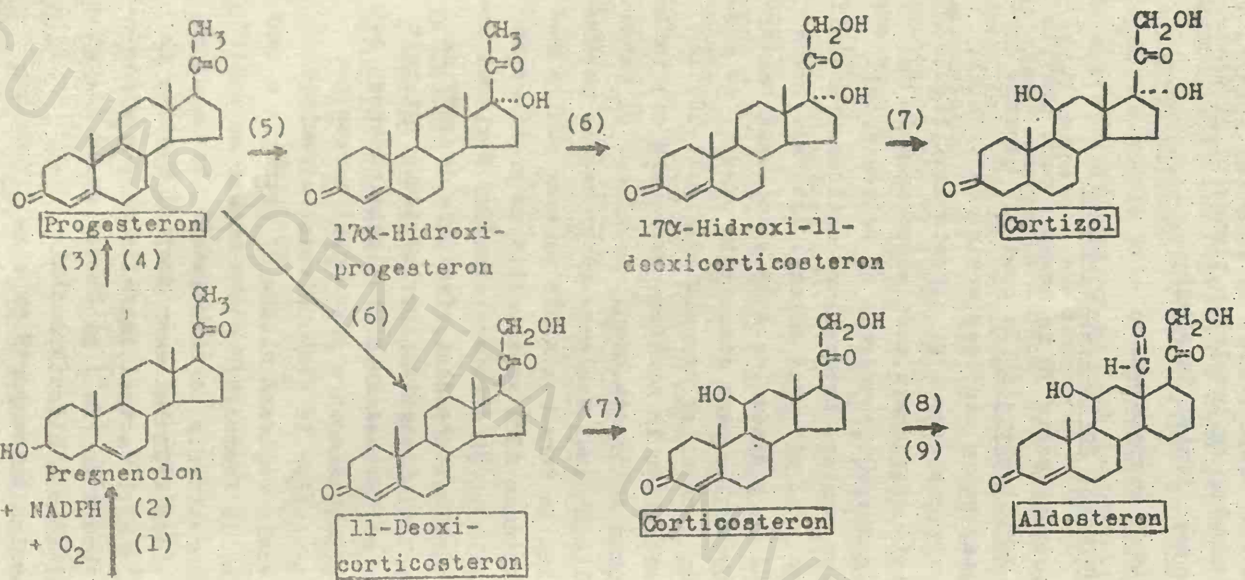


Fig.14.12.Structura şi biosinteza progesteronului şi principalilor corticosteroizi.

(1): 20-Hidroxilaza;(2): 20,22-Desmolaza;(3): 3β-ol-dehidrogenaza;(4):Δ5→Δ4-Izomeraza;(5): 17α-Hidroxilaza;(6): 21-Hidroxilaza;(7): 11β-Hidroxilaza;(8): 18-Hidroxilaza;(9): 18-Dehidrogenaza.Hidroxilazele care catalizează reacţiile indicate sînt <u>monooxigenaze</u>. Ele asigură transferul electronilor de la NADPH la O_2 prin intermediul unei flavoproteine numită <u>adrenodoxin</u> şi citocromului P_{450}.In urma acestui transfer unul din atomii de oxigen se fixează sub formă de -OH în molecula substratului,iar cel de al doilea este redus la H_2O.

reglat de hipotalamus.

Acţiunea corticosteroizilor. Hormonii corticosuprarenalei au multiple acţiuni biologice. Existenţa unei analogii structurale conferă corticosteroizilor o similitudine de acţiune fiziologică, dar nu o identitate. După predominanţa unuia din efectele hormonilor corticosteroidici se deosebesc mineralocorticoizi cu acţiune asupra metabolismului hidromineral şi glucocorticoizi cu acţiune asupra metabolismului glucidic, lipidic şi proteinic.

Acţiunea mineralocorticoizilor. Mineralocorticoizi au rol în reglarea metabolismului electroliţilor şi apei în organismul animal. Ei scad eliminarea de Na^+ şi apă din organism şi cresc evacuarea de K^+. Atît aldosteronul, cel mai activ mineralocorticoid, cît şi 11-deoxicorticosteronul cu o acţiune de 20-30 de ori mai slabă, determină creşterea reabsorbţiei de Na^+, Cl^- şi HCO_3^- la nivelul tubului renal distal, de asemenea, la nivelul glandelor sudoripare, glandelor salivare şi tractului digestiv. Totodată creşte eliminarea de K^+ şi Mg^{2+}. Reabsorbţia crescută de NaCl este asociată cu o reabsorbţie excesivă de apă. Drept consecinţă se observă modificarea permeabilităţii celulare prin intrarea Na^+ şi ieşirea K^+ şi creşterea volumului sîngelui cu repercursiuni asupra tensiunii arteriale.

Mecanismul de acţiune al aldosteronului se bazează pe stimularea sintezei de proteine ce activează pompa de reabsorbţie a apei şi Na^+.

Acţiunea glucocorticoizilor. Hormonii glucocorticoidici în raport cu metabolismul glucidelor aproape după toţi indicatorii sînt antiinsulinici (diabetogeni). Ei induc la nivelul transcrierii sinteza enzimelor-cheie ale gluconeogenezei şi a glucozo-6-fosfatazei în ficat, inhibă glicoliza şi transportul glucozei în muşchi, ţesutul adipos şi limfatic. Stimularea gluconeogenezei de aceşti hormoni într-o anumită măsură se datoreşte acţiunii lor de a intensifica procesele de transaminare şi catabolizare a unor aminoacizi. In plus, glucocorticoizi potenţiază acţiunea glucagonului şi adrenalinei asupra glicogenolizei. Deci glucocorticoizii posedă efect hiperglicemiant. Totodată glucocorticoizi, ca şi STH, stimulează sinteza glicogenului în ficat prin creşterea concen-

traţiei de glucozo-6-fosfat în procesul de gluconeogeneză.ACTH influenţează metabolismul glucidic numai prin intermediul hormonilor corticosuprarenali.

De notat că raportul nivelurilor de producere a hormonilor participanţi la reglarea metabolismului glucidelor,depinde de regimul alimentar,fazele nutriţiei,efortul muscular,intensitatea proceselor nervoase etc.

Glucocorticoizi intervin în metabolismul lipidic prin mobilizarea lipidelor din depozite şi favorizarea depunerii lor în anumite zone periferice.

In afară de aceste efecte metabolice,glucocorticoizi au proprietăţi antiinflamatoare,antiîicatrizante etc.,ce motivează utilizarea lor în terapeutică.

Glucocorticoizi sînt hormoni esenţiali pentru viaţă.Prin acţiunile lor permit organismului animal să-şi regleze raportul anabolism-catabolism pentru o cît mai eficientă funcţionalitate a metabolismului celular.Principalul corticosteroid din acest grup este cortizolul.O poziţie intermediară între aldosteron şi cortizol ocupă corticosteronul.

Corticosuprarenala unor animale - maimuţă,cobaiul - secretă predominant cortizolul,iar a altora - iepure,şoareci,păsări - în principal corticosteronul.La om,de asemenea,principalul constituent al secreţiei corticosuprarenalei este cortizolul.

Printre afecţiunile corticosuprarenalei există o serie de erori congenitale în care se semnalează deficitul enzimelor pentru sinteza corticosteroizilor.Enzimele afectate sînt 20,22-desmolaza,3β-ol-dehidrogenaza,11-hidroxilaza,17-hidroxilaza,18-hidroxilaza,21-hidroxilaza(fig.14.12).Toate aceste leziuni enzimatice conduc la o hipertrofie compensatorie a corticosuprarenalei Termenul clinic al acestor tulburări este de hiperplazie congenitală a corticosuprarenalei.

14.1.4.2.Hormoni gonadali

Hormonii gonadali sînt sintetizaţi de către gonade pe baza programului genetic deţinut în genezomi.Ca instrumente operaţionale ale cromozomilor de sex,hormonii gonadali intervin în sexualizarea organismului.In funcţie de sexul gonadei se deosebesc

hormoni testiculari(androgeni) şi ovarieni.

14.1.4.3.1.Hormoni androgeni

Androgenii(de la grecescul andros=bărbat),numiţi şi hormoni sexuali masculini se formează în celulele interstiţiale Leydig ale testiculului şi ovarului,de asemenea,în zona reticulată a corticosuprarenalei şi în placentă.Principalul hormon androgen secretat de testicul este testosteronul(fig.14.13).Intre androgenii corticosuprarenalei se menţionează androstendionul.In placentă şi în ţesuturile periferice testosteronul se transformă în 5α-dihidrotestosteron(5α-DHT) sau androstanolon.

Biosinteza androgenilor(fig.14.13) pleacă de la colesterol, cu formarea pregnenolonului şi progesteronului ca produşi intermediari(fig.14.12).Stadiile limitante în biosinteza testosteronului sînt,probabil,hidroxilarea colesterolului şi scindarea catenei lui laterale.Biosinteza androgenilor în gonade este stimulată de LH care creşte preluarea colesterolului de celulele Leydig şi conversia lui în pregnenolon.

In organismul animal androgenii se metabolizează prin transformare în 17-cetosteroizi sau prin conjugare cu acidul glucuronic ori H_2SO_4.Toţi aceşti metaboliţi se elimină preferenţial în urină,iar la unele animale(şoarece) şi cu bila.

Acţiunile androgenilor pot fi grupate în acţiuni metabolice şi acţiuni glandulare.

Androgenii posedă un puternic efect anabolic asupra metabolismului azotului şi calciului.Testosteronul stimulează sinteza proteinelor,accelerînd creşterea ţesuturilor şi organismelor tinere.Apoi androgenii cresc sinteza glicerofosfatidelor în diferite membrane,mai ales în membranele plasmatice şi reticulul endoplasmatic.Aceşti hormoni au influenţă anabolică,de asemenea,asupra ţesutului osos,determinînd absorbţia intestinală a Ca^{2+} şi fixarea lui în matricea osoasă.

Acţiunile glandulare ale androgenilor sînt necesare în morfogeneza şi funcţionalitatea normală a structurilor sexuale,precum şi în inducerea caracterelor sexuale secundare masculine.

Mecanismul de acţiune al androgenilor afectează procesele de sinteză a ARN în nucleu şi de translaţie în ribozomi.

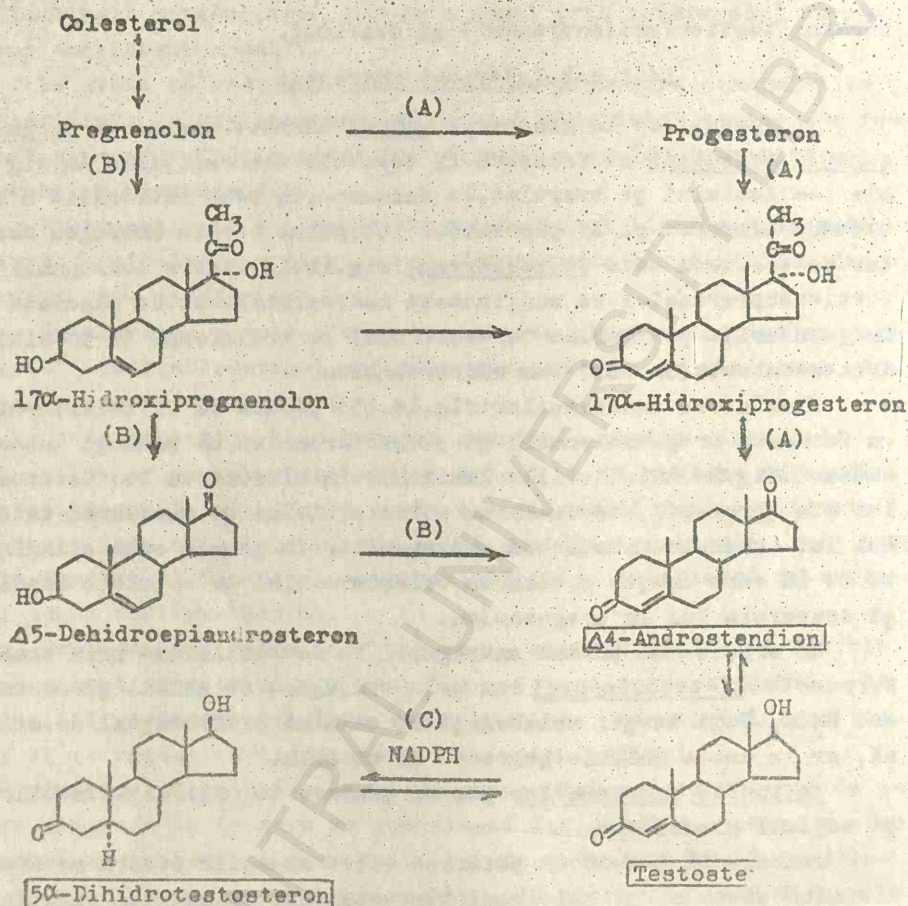


Fig.14.13. Căile de sinteză a principalilor androgeni în gonade (A), corticosuprarenală (B) și placentă (C).

Inhibina

Inhibina este o metalglicoproteină sintetizată în testicul; ea previne hipertrofia hipofizei la masculii animalelor. Se presupune că inhibina are rol în reglarea raportului FSH și LH, secretați ca răspuns la acțiunea hormonilor reglatori ai hipotalamusului și la influența feedback exercitată de hormonii gonadali.

14.1.4.2.2. Hormoni ovarieni

Hormonii ovarieni cuprind grupa progestagenilor şi grupa estrogenilor.

Hormoni progestageni

Principalul reprezentant al grupei este progesteronul. Slabă activitate gestagenică posedă, de asemenea, 17α-hidroxiprogesteronul şi 20α-dihidroprogesteronul.

Biosinteza progestagenilor se desfăşoară predominant în corpul galben al ovarului şi în placentă. O cantitate de progestageni se formează, de asemenea, în celulele foliculare ovariene şi în testicul. In general, formarea progestagenilor în ovar şi placentă este asemănătoare cu biosinteza acestor hormoni în corticosuprarenală, unde progesteronul şi 17α-hidroxiprogesteronul sînt normal produşi intermediari în biogeneza corticosteroizilor. Raportul progestagenilor în sîngele care pleacă de la celulele ce-i sintetizează nu este identic la diferitele specii de animale şi depinde de starea fiziologică a organismului. De exemplu, la cîine ovarul secretă predominant progesteronul, iar la şoarece cantitatea 20α-dihidroprogesteronului depăşeşte de 2-3 ori cantitatea celui mai activ progestagen. La iepure, raportul acestor hormoni se modifică în funcţie de stadiul de dezvoltare a corpului galben. LH şi gonadotropina corionică stimulează biosinteza progestagenilor, de asemenea, ovulaţia şi formarea corpului galben în ovar la toate mamiferele. Indirect, intensitatea formării progestagenilor poate fi influenţată de prostaglandina $F_{2\alpha}$.

Progestagenii sînt transportaţi în sînge legaţi cu globulina serică, care vehiculează, de asemenea, corticosteroizii.

Acţiunile progestagenilor interesează diferenţierea celulelor tractului genital în funcţia de reproducere. Ei pregătesc ţesutul uterin pentru nidarea (implantarea) ovulului fecundat. Aceşti hormoni favorizează menţinerea sarcinii, în timpul căreia inhibă ovulaţia şi participă la pregătirea glandelor mamare pentru lactaţie.

Ca efecte metabolice ale progestagenilor notăm influenţa lor asupra anabolismului proteinic şi metabolismului hidromineral.

Hormoni estrogeni

Foliculul ovarian uman sintetizează trei hormoni estrogeni, cunoscuţi sub numele de estronă sau foliculină(E_1),estradiol(E_2) şi estriol(E_3)(fig.1414),dintre care cel mai activ este E_2.La mamifere estrogenii,de asemenea,se formează în placentă şi testicul.In ţesuturile diferitelor specii de animale au fost identificaţi şi alţi estrogeni.De exemplu,pentru cabaline sînt specifice equilina,equilenina şi dihidroequilenina(fig.14.14).Este necesar să notăm că estrona a fost descoperită în unele plante(măr,rodie, curmale,salcie),precum şi în bacterii.

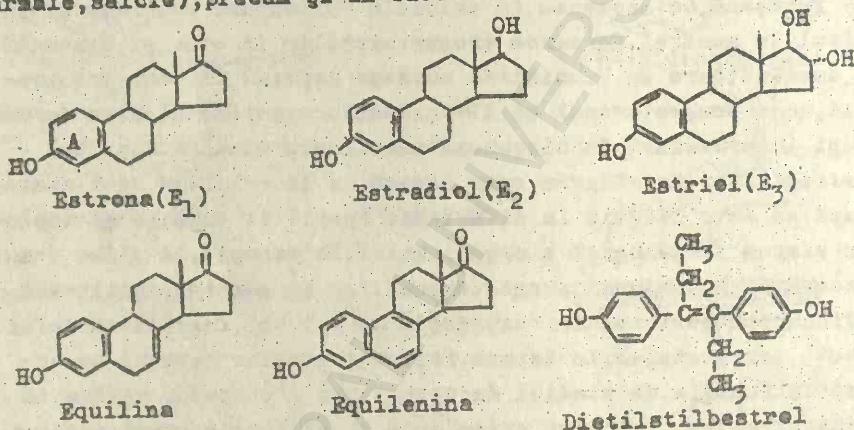


Fig.14.14.Cei mai importanţi estrogeni naturali şi sintetici.

Structura chimică a estrogenilor se distinge prin scheletul steroidic cu 18 C,inelul aromatic A şi prezenţa -OH în poziţia 3.

Activitate estrogenă posedă de asemenea unele substanţe organice sintetice nestreidice,ca de exemplu dietilstilbestrolul.

Biosinteza estrogenilor poate avea loc din colestrol care este transformat în pregnenolon,progesteron şi derivaţii lor 17-hidroxilaţi,iar mai departe în androgeni(fig.14.13).Androgenii, avînd legătură dublă în poziţia 4,5 constituie cei mai apropiaţi precursori ai estrogenilor.Cele mai importante etape în formarea structurii caracteristice a estrogenilor(C_{18}-steroizi) sînt:1) eliminarea C-19(grupa metil) din molecula androgenului precursor şi 2)aromatizarea inelului A.

Biosinteza estrogenilor în ovar,corpul galben şi testicul

se află sub controlul LH,FSH şi prolactinei.Estrogenii sintetizaţi sînt depozitaţi în lichidul foliculului ovarian şi secretaţi în cantităţi mari cu ocazia ovulaţiei.Eliminarea estrogenilor din organism se face pe cale renală,sub formă liberă şi conjugată.

Acţiunile biologice ale estrogenilor în organismul animal sînt multiple.

Activitatea principală a estrogenilor este îndreptată spre menţinerea capacităţii de reproducere a organismului.In acest sens ei stimulează creşterea şi diferenţierea celulelor tractului genital.Estrogenii manifestă o puternică influenţă asupra uterului,promovînd proliferarea ţesuturilor lui;cu această ocazie are loc activarea tuturor proceselor metabolice,dezvoltarea vascularizării şi accelerarea diviziunii celulare.Estrogenii posedă un efect anabolic şi de creştere nu numai la nivelul tractului genital,dar şi în ficat,rinichi,miocard etc.Aceşti hormoni determină retenţia de azot şi prin urmare intensifică anabolismul proteinic în organism.Totodată ei produc retenţie hidrosodică şi favorizează eliminarea K^+.

In perioada pre- şi pubertară hormonii estrogeni definitivează caracterele sexuale secundare feminine(glandă mamară,conformaţia bazinului,topografia ţesutului adipos).De importanţă deosebită este rolul estrogenilor în reglarea ritmicităţii secreţiei ovariene prin feedback negativ cu celulele gonadotrope hipofizare şi prin feedback pozitiv cu celulele hipotalamice producătoare de LRH.

Relaxina

Ovarul şi placenta produc un hormon,de natură polipeptidică, numit relaxină.După structura chimică relaxina este foarte asemănătoare cu insulina.Molecula relaxinei,de asemenea,este alcătuită din două lanţuri polipeptidice neidentice(A şi B),unite între ele prin două legături disulfidice,lanţul A conţinînd o punte disulfidică intracatenară.Lanţul A al relaxinei are 22 resturi de aminoacizi(în loc de 21 la insulină),iar lanţul B - tot ca şi la insulină,30 aminoacizi.Insă structura primară a celor doi hormoni diferă esenţial.

In urma acţiunii relaxinei organele de reproducere la mamifere devin apte pentru naştere.

14.1.5. Hormoni tisulari

14.1.5.1. Neurotransmiţători şi neurohormoni

Neuronii au capacitatea de a sintetiza şi elibera substanţe biologic active, care pot acţiona fie asupra celulei vecine, în sens excitator sau în sens inhibitor, fie asupra unor celule mai îndepărtate. In primul caz se vorbeşte despre <u>neurotransmiţători</u> sau <u>neuromediatori chimici</u>, iar în al doilea - despre <u>neurohormoni</u>. Cele două noţiuni se acceptă numai în sens operaţional, deoarece una şi aceeaşi substanţă într-o situaţie poate interveni ca neuromediator, iar în alta ca hormon.

<u>Neuromediatorii</u> au în majoritatea cazurilor o structură chimică simplă şi cuprind catecolaminele, acetilcolina, serotonina, acidul glutamic, acidul γ-aminobutiric, glicocolul etc.

<u>Acetilcolina</u>(ACh), esterul colinei cu acidul acetic, se întîlneşte în multe din organele vertebratelor, cu preponderenţă în terminaţiile nervilor parasimpatici şi nervilor motori ai sistemului somatic. ACh se sintetizează în organism sub acţiunea enzimei <u>colin-acetiltransferaza</u> sau <u>colintransacetilaza</u>, numită iniţial <u>colinacetilază</u>(ChAcT care transferă radicalul acetil de la acetil-CoA la colină(fig.14.15). ChAcT din creierul de iepure a fost purificată şi caracterizată de Vlad Artenie(1966).

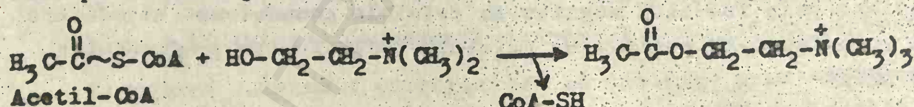


Fig.14.15. Biosinteza acetilcolinei.

Inactivarea ACh în organism se datoreşte <u>colinesterazei nespecifice</u>(<u>pseudocolinesterazei</u>) care se găseşte la mamifere în mod predominant în plasmă, ficat şi muşchii netezi şi <u>acetilcolinesterazei</u>(<u>colinesteraza adevărată</u>), prezentă mai ales în ţesutul nervos şi eritrocite.

ACh îndeplineşte rolul de mediator chimic la nivelul joncţiunii neuromusculare striate, al terminaţiilor nervoase parasimpatice, al sinapselor din ganglionii vegetativi, al terminaţiilor nervoase din medulosuprarenală şi la nivelul unor sinapse din sistemul nervos central.

Serotonina(5-hidroxitriptamina) se formează prin transformarea triptofanului în 5-hidroxitriptofan şi decarboxilarea ultimului(fig.14.4).

Cantităţi de serotonină cu semnificaţie biologică se găsesc în mucoasa tractului gastrointestinal, plachete, splină şi în sistemul nervos central. Plachetele nu sînt capabile să sintetizeze serotonina, însă ele o pot capta din sînge unde este liberată de celulele enterocromafine ale tractului digestiv.

Funcţiile biologice ale serotoninei se află încă în studiu. Se presupune că această amină ar constitui mediatorul chimic al mişcărilor peristaltice şi ar fi implicată în procesul de coagulare a sîngelui. Scăderea conţinutului de serotonină în sînge la om este asociată cu instalarea migrenei, ceea ce constituie un argument pentru funcţia de neuromediator în neuronii serotoninergici.

Acidul glutamic şi produsul lui de decarboxilare, acidul γ-aminobutiric se găsesc în concentraţii mari în creier. Acidul glutamic aparţine celor mai importanţi mediatori ai excitaţiei în sistemul nervos central al nevertebratelor. Acidul γ-aminobutiric, ca şi glicocolul se consideră mediatori ai inhibiţiei în sistemul nervos. In ce priveşte rolul acestor combinaţii la vertebrate, rămîn încă probleme de elucidat. Dacă mediatorii excitaţiei produc depolarizarea membranei postsinaptice, atunci mediatorii inhibiţiei favorizează hiperpolarizarea, probabil prin scăderea conductibilităţii membranelor în raport cu K^+ şi Cl^-. Ca rezultat în prezenţa mediatorilor inhibiţiei excitaţia membranei postsinaptice are loc mai greu decît în absenţa lor.

Intre neurohormoni pot fi menţionate DOP-amina(p.344), noradrenalina, histamina şi alte substanţe.

Histamina(β-imidazoliletilamina) se găseşte în toate ţesuturile animale, unde se formează prin decarboxilarea histidinei. Nivelul histaminei în organe variază cu specia şi este corelat cu densitate mastocitelor. Aproape toată cantitatea de histamină din ţesuturi se află în stare biologic inactivă, fiind legată, probabil cu heparina.

Dintre multiple funcţii fiziologice, ce se atribuie histami-

nei,pînă în prezent au fost dovedite experimental: 1)rolul de hormon gastrosecretor,histamina stimulînd aproape exclusiv secreţia de HCl a celulelor parietale gastrice;2)împreună cu catecolaminele şi serotonina,histamina ar fi implicată în activitatea sistemului nervos central,unde ar participa la controlul stării de trezire;3)histamina intervine în producerea senzaţiilor de mîncărime datorate diverselor afecţiuni cutanee şi de durere la nivelul pielii.

14.1.5.2.<u>Eicosanoizi</u> : <u>derivaţi</u> <u>ai</u> <u>acizilor</u> <u>graşi</u> <u>polinesaturaţi</u> <u>cu</u> <u>20 C</u>

Cercetările cu izotopi radioactivi au arătat că acizii graşi C_{20} cu 3-5 duble legături în moleculă constituie precursorii unor substanţe fiziologic şi farmacologic active,cunoscute sub numele de prostaglandine,tromboxani şi leucotriene.

<u>Prostaglandine</u>

Prostaglandinele(PG) au fost descoperite iniţial în plasma seminală(W.Goldblat şi U. von Euler,1930). In prezent se ştie că PG se găsesc în orice ţesut de mamifere şi au importante acţiuni fiziologice şi farmacologice.PG se sintetizează în celula vie prin ciclizarea părţii centrale,între C-8 şi C-12,din catena carbonică a acizilor graşi polinesaturaţi cu 20 C,în urma căreia se formează ciclul pentanic(fig.14.16).Aceşti acizi graşi polinesaturaţi conţin cel puţin trei duble legături şi iau naştere din fosfolipidele membranare sub acţiunea fosfolipazei A_2.

Biosinteza PG are loc cu un consum de $2O_2$ şi este catalizată de PG endoperoxidsintază care posedă două activităţi catalitice separate,<u>ciclooxigenazică</u> şi <u>peroxidazică</u>.Aspirina inhibă ciclooxigenaza.Ca intermediari în reacţia catalizată de ciclooxigenază apar endoperoxizii prostaglandinici PGG şi PGH care apoi sînt convertiţi în PG(fig.14.16).Principalele clase de PG sînt desemnate prin PGA,PGB,PGE şi PGF.Există trei serii de PG caracterizate prin numărul de duble legături în catenele alifatice şi anume seriile 1,2 şi 3.

<u>Acţiunile biologice ale PG</u> sînt foarte diverse.Astfel,PG ar juca rol în reglarea funcţiilor fiziologice ale sistemului de reproducere,modularea activităţii sistemului nervos,reglarea

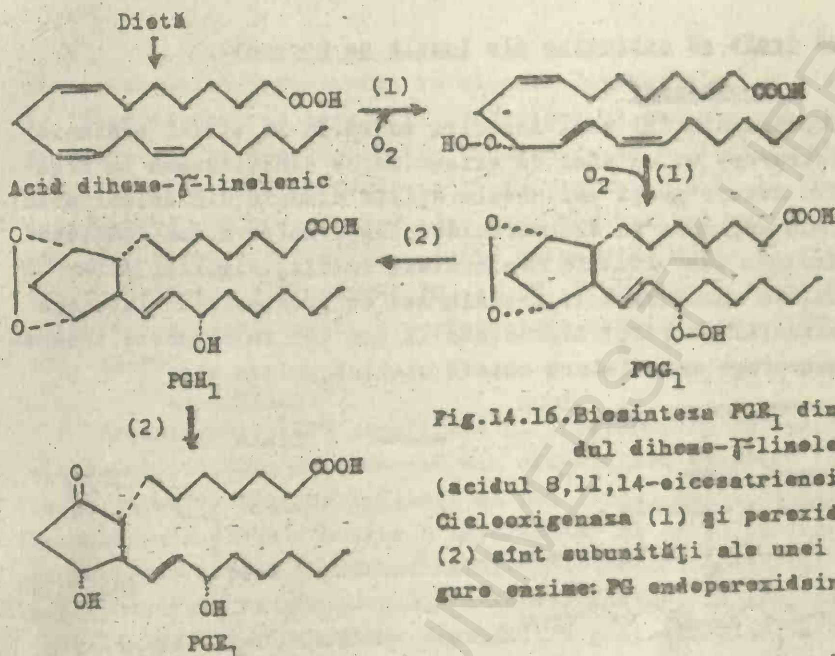


Fig.14.16.Biosinteza PGE_1 din acidul dihomo-γ-linolenic (acidul 8,11,14-eicosatrienoic). Cicloxigenaza (1) şi peroxidaza (2) sînt subunităţi ale unei singure enzime: PG endoperoxidsintaza.

secreţiei gastrice,medierea inflamaţiei,patogenia trombozelor vasculare,moderarea lipolizei provocată de hormonii lipolitici sub influenţa agenţilor stresanţi.

Scindarea acilglicerolilor în ţesutul adipos este stimulată de adrenalină,glucagon,ACTH şi TSH.PGE_1 în concentraţie de 10^{-8}M inhibă puternic efectele lipolitice ale hormonilor menţionaţi prin diminuarea nivelului de AMP ciclic în adipocite.

PG determină creşterea AMPc ca urmare a stimulării adenilat-ciclazei în plachete,tiroidă,corpul galben,adenohipofiză.

Interesant de semnalat că în stomacul femelelor speciei de broască Rheobatrachus vitellinus(Queensland - Australia) se găseşte PGE_2 capabilă să suprime secreţia sucului gastric.Astfel se explică că aceste broscuţe înghit ouăle,le clocesc în stomac şi apoi „nasc" puii eliminîndu-i prin gură,descoperire făcută în 1972.

Referindu-ne la rolul fiziologic al PG,trebuie să reţinem că funcţia lor este strîns corelată cu reglarea activităţii hormonale,în sensul că PG par să moduleze acţiunea hormonilor mai

degrabă decît să acţioneze ele însele ca hormoni.

Tromboxani

Tromboxanii(TX) sînt înrudiţi cu PG. In TX ciclul pentanic este întrerupt cu un atom de oxigen. TX se sintetizează în organism din acizii graşi polinesaturaţi. De exemplu, din acidul arahidonic, sub acţiunea PG endoperoxidsintazei se formează PGG_2, apoi PGH_2 care este convertit de TX-sintetază în TXA_2 (fig.14.17). Peroxidul PGH_2 de asemenea este transformat de prostaciclinsintetază în prostaciclină(PGI_2). Biosinteza TX are loc în plachete, trombocite, macrofage, musculatura netedă uterină, pulmon etc.

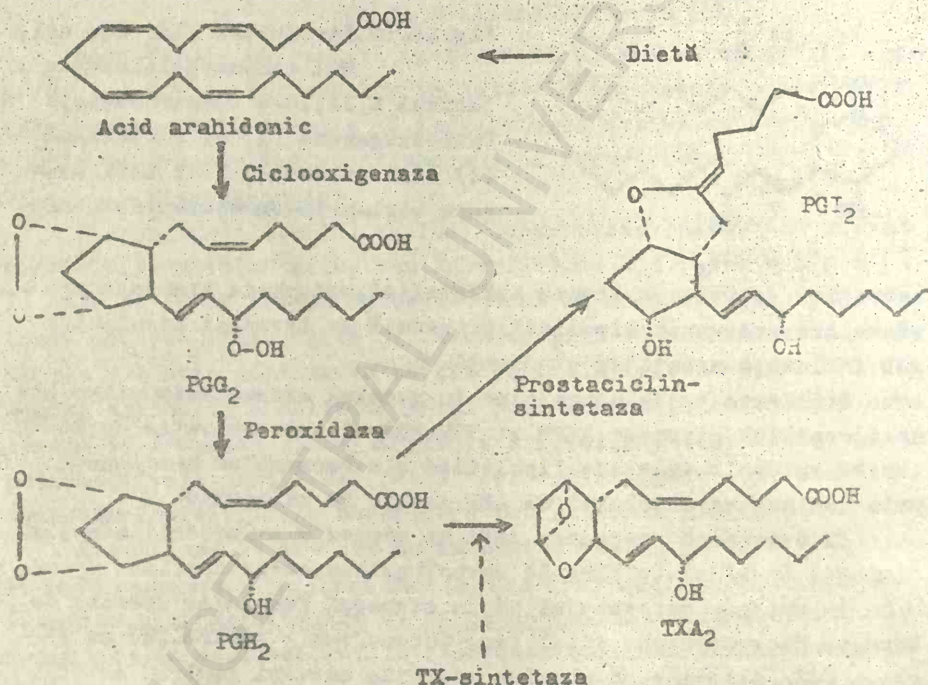


Fig.14.17. Conversia acidului arahidonic în tromboxanul A_2 şi prostaciclină(PGI_2).

TX produc vasoconstricţie şi agregarea plachetară, jucînd un rol important în hemostază. Creşterea formării de tromboxani predispune la tromboze. In acţiunea lor, TX din seria 2(TX_2) sînt antagonişti faţă de prostaciclină(antiagregantă plachetară şi vasoconstrictoare). Perturbarea echilibrului dintre PGI_2 şi TX_2 stă la

baza patogeniei infarctului de miocard. Incidenţa scăzută a bolilor de inimă, diminuarea agregării plachetare şi prelungirea timpilor de coagulare la eschimoşii din Groenlanda se atribuie, probabil, consumului de ulei de peşte conţinînd acidul 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic(acid timnodenic) care este precursorul seriei 3 de PG (PG_3) şi TX(TX_3). PG_3 şi TX_3 inhibă eliberarea acidului arahidonic din fosfolipide şi formarea PG_2 şi TX_2. Tromboxanii A_2 şi B_2 reduc activitatea adenilatciclazei plachetare, opunîndu-se acţiunii PGI_2 şi PGE.

Leucotriene

Leucotrienele(LT) constituie al treilea grup de derivaţi eicosanoidici care se formează din acidul arahidonic în leucocite pe calea reacţiilor iniţiate de C-5 lipoxigenază(Borgeat P., Samuelsson B., 1979). Ca produs intermediar al căii lipoxigenazice se formează acidul 5-hidroperoxieicosatetraenoic(5-HPETE) care este convertit în LTA_4, aceasta metabolizîndu-se în LTB_4 sau LTC_4 (fig. 14.18). LTC_4 ia naştere după adiţia glutationului redus printr-o legătură tioeterică în poziţia 6 a LTA_4. Indepărtarea ulterioară a acidului glutamic şi glicocolului generează LTD_4 şi LTE_4. „Slow reacting substance of anaphylaxis(SRS-A)" reprezintă un amestec de leucotriene C_4, D_4 şi E_4. Mixtura de leucotriene este de 100-1000 ori mai eficace decît histamina sau PG în privinţa stimulării constrictoare a musculaturii bronhice. LT joacă rolul de mediatori chimici în inflamaţie şi anafilaxie.

14.1.6. Factori de creştere

Factorii de creştere sînt proteine cu acţiune hormonală care stimulează diviziunea, diferenţierea şi proliferarea celulelor-ţintă. Pînă acum s-au caracterizat factorul de creştere al nervilor, factorul de creştere epitelială, factorul de creştere al fibroblaştilor etc.

Factorul de creştere al nervilor(NGF) constă din două lanţuri polipeptidice identice de 13.259 D fiecare. Acest dimer(numit subunitate β) a fost izolat din glandele salivare submaxilare de şoarece sub forma unui complex proteinic de 130.600 D cu structura $\alpha_2\gamma_2\beta$. Subunitatea γ este o enzimă proteolitică, iar subunitatea α inhibă această protează. NGF este sintetizat ca prohormon conţi-

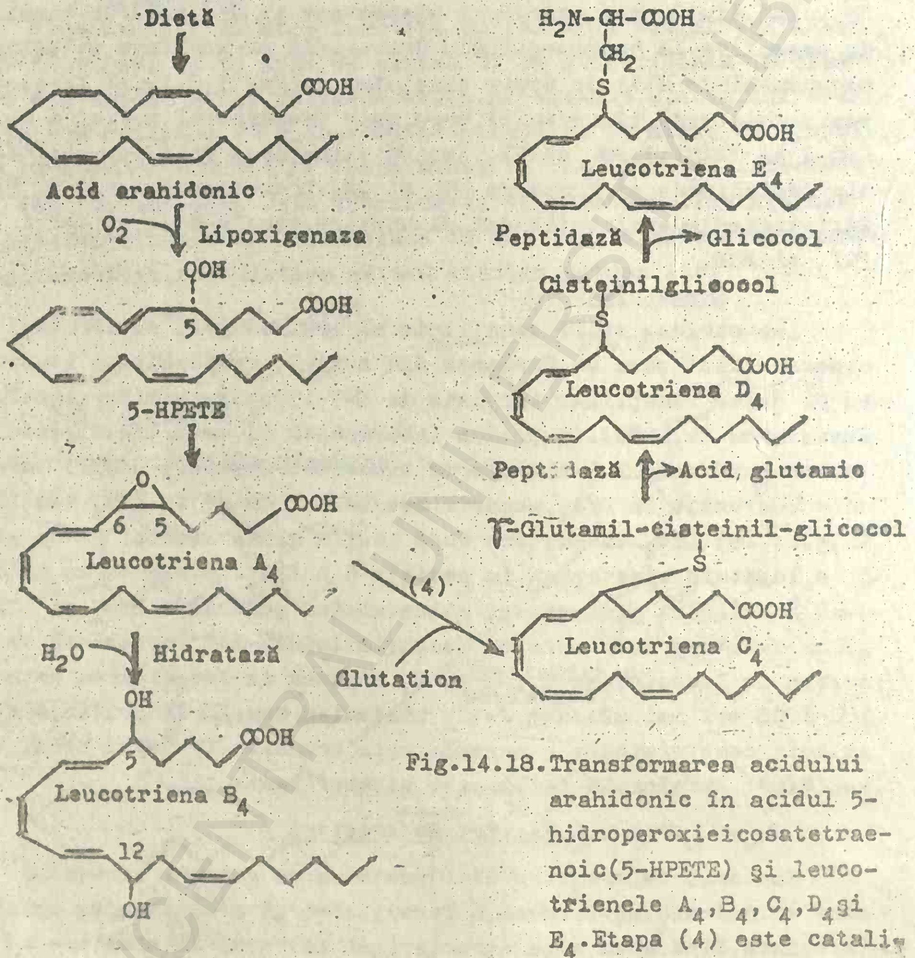


Fig.14.18. Transformarea acidului arahidonic în acidul 5-hidroperoxieicosatetraenoic(5-HPETE) și leucotrienele A_4, B_4, C_4, D_4 și E_4. Etapa (4) este catalizată de glutation-S-transferază.

nînd subunitățile α și β care sînt apoi clivate de γ-protează. Structura primară a NGF(118 aminoacizi) prezintă o omologie evidentă cu secvența aminoacizilor în molecula proinsulinei(fig. 14.11).

NGF joacă rol esențial în creșterea neuronilor simpatici și a unor neuroni sensitivi la vertebrate, stimulînd procesele anabolice și energetice în celula-țintă.

Factorul de creştere epitelială(EGF) este o polipeptidă descoperită iniţial în glandele salivare submaxilare de şoarece.EGF conţine 53 de aminoacizi şi are M=6.045 D.Structura EGF de şoarece este asemănătoare cu a EGF uman,deci această proteină nu s-a schimbat în procesul de evoluţie.EGF stimulează creşterea celulelor epidermale şi epiteliale.El se leagă puternic cu receptorii din membrana plasmatică a celulelor-ţintă.

Factorul de creştere al fibroblaştilor(FGF) se sintetizează în hipofiză şi stimulează creşterea fibroblaştilor,de asemenea, a altor tipuri de celule de origine mezodermică.Este o proteină cu M=13.400 D.FGF acţionează împreună cu glucocorticoizii.

14.2.HORMONII NEVERTEBRATELOR

Hormonii se sintetizează şi în organismul nevertebratelor. Cel mai bine studiaţi în prezent sînt hormonii crustaceelor şi hormonii insectelor.

14.2.1.Hormonii crustaceelor

La crustacee hormonii reglează procesele metabolice,creşterea,năpîrlirea,dezvoltarea caracterelor sexuale primare şi secundare,maturarea ovarelor,schimbarea culorii corpului şi adaptarea ochilor la lumină sau întuneric.

Reglarea năpîrlirii(ecdysis) crustaceelor se află sub controlul a trei hormoni.Hormonul năpîrlirii,sintetizat de organele Y produce declanşarea prenăpîrlirii(proecdysis) şi năpîrlirii,de asemenea,reglează mobilizarea calciului din vechea crustă şi depunerea lui în gastrolite şi alte depozite.Hormonul inhibitor al năpîrlirii,care este eliberat de organele X ale ganglionilor terminali,acţionează asupra organelor Y,inhibînd secreţia hormonului năpîrlirii de către aceste adevărate glande endocrine.Sub influenţa impulsurilor nervoase pătrunderea hormonului inhibitor al năpîrlirii în hemolimfă,la un moment determinat,se întrerupe.Organele Y încep să secrete hormonul năpîrlirii.Secreţia acestui hormon de către organele Y este stimulată de hormonul accelerator al năpîrlirii,care se formează în creier,ganglionii terminali şi pectorali.

Hormonul organelor Y,implicat în reglarea năpîrlirii la

crustacee, este asemănător cu hormonul care controlează năpîrlirea şi metamorfoza insectelor. Acest hormon numit crustecdisonă este de fapt 20-hidroxiecdisona(fig.14.19).

Dezvoltarea gonadelor la ambele sexe de crustacee este influenţată de hormonul gonadotrop, eliberat de organele Y.

Culoarea corpului crustaceelor depinde de cromatoforii existenţi în hipodermă şi ţesutul conjunctiv. Concentrarea şi dispersarea pigmenţilor în cromatoforii crustaceelor se realizează datorită acţiunii hormonilor cromatoforotropi. Ei sînt polipeptide cu masa moleculară comparativ mică, se descompun în prezenţa enzimelor proteolitice, dar au o rezistenţă suficientă la încălzire. Hormonii cromatoforotropi se găsesc în glandele sinusale şi organele postcomisurale.

14.2.2. Hormonii insectelor

In organismul insectelor hormonii se formează în celulele neurosecretoare din creier şi diferiţi ganglioni, de asemenea, în glandele endocrine din care fac parte corpora cardiaca, corpora allata şi glandele protoracice. Hormonii insectelor controlează metabolismul substanţelor şi cele mai importante procese ale ontogenezei: creşterea, năpîrlirea, metamorfoza etc.

Celulele neurosecretoare ale creierului sintetizează cel puţin trei neurohormoni. Unul din ei - hormonul protoracotropic sau ecdisiotropina reglează funcţia glandei protoracice care secretă ecdisona, cunoscută ca hormonul năpîrlirii(ecdysis) la insecte. Alt neurohormon - hormonul de activare - influenţează corpora allata ce sintetizează hormonul juvenil în larvele de insecte. Celulele neurosecretoare din creier formează încă un hormon, numit bursicon, sub acţiunea căruia are loc închiderea culorii şi întărirea cuticulei la insecta matură după ieşirea din pupă. Bursiconul este o proteină cu masa moleculară de 40.000 D.

Ecdisona este un steroid cu o grupă cetonică, 5 grupe hidroxil şi o dublă legătură în inelul B(fig.14.19). Ecdisona a fost izolată pentru prima dată din pupele de Bombyx mori de către A. Butenandt şi P. Karlson(1954). Ulterior la diferite insecte s-au descoperit şi alţi derivaţi ai ecdisonei. Unul din ei este β-ecdisona, de asemenea, numită ecdisteronă sau crustecdisonă, ori siste-

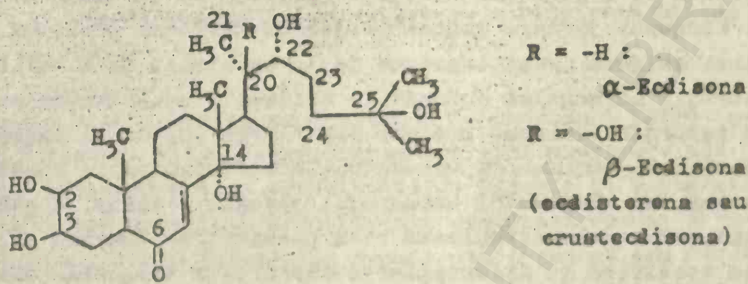


Fig.14.19.Structura ecdisonelor izolate din insecte şi crustacee.

matic,<u>20-hidroxiecdisonă</u>.In afară de aceşti doi hormoni principali,încă o serie de compuşi minori s-au detectat în insecte şi crustacee.Prezintă desigur interes faptul că plantele conţin un număr mare de steroizi asemănători ecdisonelor,de unde denumirea de <u>fitoecdisone</u>.

Deşi ecdisonele acţionează ca hormoni larvari,în cantitate mare ele sînt toxice pentru insecte.Atunci care este rolul fiziologic al fitoecdisonelor?La această întrebare incitantă se poate răspunde numai parţial.Probabil,plantele sintetizează ecdisonele pentru apărarea împotriva insectelor.

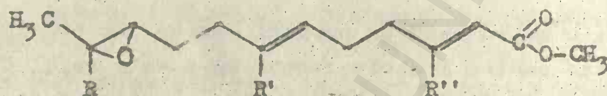
Biosinteza ecdisonei în insecte are încă puncte neelucidate. Se cunoaşte că drept precursor în majoritatea insectelor serveşte colesterolul legat din lipoproteinele hemolimfei.Se impune să menţionăm că insectele nu sînt capabile să sintetizeze colesterolul din acetat pe calea mevalonat-farnezildifosfatului.Nu se ştie exact care etapă este întreruptă,probabil datorită pierderii genelor ce codifică enzimele corespunzătoare.Multe insecte fitofage convertesc fitosterolii cu 28 sau 29 C în colesterol prin inversarea reacţiilor de biosinteză specifice plantelor.

S-a stabilit că ecdisona iniţiază năpîrlirea la insecte,inducînd sinteza enzimelor implicate în metabolismul chitinei: la început a chitinazei care descompune vechea cuticulă,apoi a DOPA-decarboxilazei şi a altor enzime cu rol în formarea scleroproteinelor cuticulei noi.In plus,ecdisonele stimulează proliferarea celulelor epidermice ale larvelor.Inainte de fiecare năpîrlire

secreţia acestor hormoni creşte,iar în procesul de năpîrlire scade. Cînd în organismul larvelor simultan cu ecdisona este secretat şi hormonul juvenil atunci creşterea larvelor continuă şi năpîrlirea asigură numai trecerea de la un stadiu la altul. Cînd însă secreţia hormonului juvenil în ultimul stadiu larvar se diminuează puternic,ecdisona produce năpîrlirea pupală şi imaginală. In stadial de crisalidă, concentraţia ecdisonelor în hemolimfă este maximă,iar conţinutul hormonului juvenil - minim. In stadiul de pupă,ecdisonele stimulează liza ţesuturilor larvare şi invaginaţia specifică şi diferenţierea discurilor imaginale ale larvelor în organele insectelor mature,deci procesele de metamorfoză.

Ecdisonele îşi exercită efectele lor,influenţînd transcrierea în cromozomi,prin intensificarea formării unor ARNm specifici(P.Karlson,1965). In plus,aceşti hormoni stimulează şi translaţia.

<u>Hormonul juvenil</u> este esterul metilic al unui acid sesquiterpenic(fig.14.20),înrudit cu farnezolul.



$R=R'=R''= -C_2H_5$: HJ O *Manduca sexta*(Sfinxul tutunului)

$R=R'= -C_2H_5$; $R''= -CH_3$: HJ I } Melia *Cecropia*

$R=R''= -CH_3$; $R'= -C_2H_5$: HJ II }

$R=R'=R''= -CH_3$: HJ III *Manduca sexta*

Fig.14.20.Structura hormonilor juvenili(HJ) la diferite insecte.

Hormonul juvenil,numit încă <u>hormon larvar</u> previne trecerea larvei în pupă şi în insectă matură,deci inhibă metamorfoza şi stimulează gametogeneza.

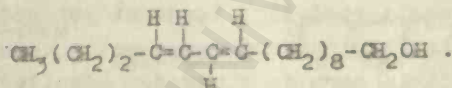
Corpora cardiaca elaborează <u>hormonul hiperglicemiant</u> şi <u>hormonul adipokinetic</u> care reglează metabolismul glucidelor şi respectiv metabolismul lipidelor. Primul hormon activează α-glucanfosforilaza care scindează glicogenul în ţesutul adipos,cu formarea trehalozei şi creşterea concentraţiei acestei dizaharide(forma de transport a glucidelor) în hemolimfă. Hormonul adipokinetic al insectelor stimulează în ţesutul adipos hidroliza triacilglicerolilor pînă la diacilgliceroli - forma de transport a

lipidelor - şi favorizează utilizarea lor în muşchi,predominant în muşchii de zbor.

Feromoni

Feromonii sînt definiţi ca substanţe de informare între insecte.După P.Karlson şi M.Lüscher,feromonii alcătuiesc o clasă de substanţe biologic active sintetizate de animale şi eliberate în mediul exterior,provocînd la indivizii aceleiaşi specii o reacţie caracteristică(de exemplu,un anumit comportament sau reflexe sexuale).Exemple clasice de feromoni sînt atractanţii sexuali, care servesc pentru atragerea indivizilor de sex opus ai aceleiaşi specii.Atractanţii sexuali au fost descoperiţi la unele crustacee şi la foarte multe insecte.

Din glandele odorifere ale femelelor de Bombyx mori a fost izolat primul atractant sexual numit bombycol care are structura:



In glandele odorifere el se găseşte sub formă de ester sau ceridă,care prin hidroliză enzimatică trece într-o substanţă uşor volatilă.Pentru a provoca reacţia masculilor de Bombyx mori este necesară o concentraţie de 1000 molecule de bombycol într-un m^3.

Feromonii se răspîndesc în aer pe calea difuziei.De la locul de eliberare de către glandele odorifere ale femelei concentraţia feromonului în mediul înconjurător scade treptat.In jurul femelei există aşa-numitul „spaţiu activ",în limitele căruia concentraţia moleculelor de feromon este suficientă pentru a atrage masculii speciei respective.De exemplu,la omida păroasă a stejarului(Lymantria dispar L.),în condiţii de vînt moderat „spaţiul activ" are forma semielipsoidală cu axa longitudinală pînă la 4.560 m şi axa transversală de circa 200 m.

Studiul atractanţilor sexuali ai fluturilor de noapte a arătat că mulţi feromoni sînt esteri ai alcoolilor alifatici nesaturaţi cu acidul acetic sau acidul izovalerianic.De exemplu, feromonul produs de Nudaurelia cytherea este cis-5-decenil-izovalerianat.Uneori rol de feromon posedă anumite hidrocarburi(2-metil-heptadecan).

Insă în puţine cazuri glandele odorifere ale femelelor de fluturi eliberează numai o singură substanţă.La majoritatea speciilor glandele odorifere secretă un amestec de cîteva substanţe, din care una serveşte drept component principal.Aşa,la multe specii de omizi tercătoare(Tortricidae),molii(Pyralidae) şi alţi fluturi feromonul este un amestec din două substanţe apropiate. Cel mai adesea acestea sînt alcooli alifatici nesaturaţi cu 10-14 C sau acetaţii lor.

In afară de atractanţii sexuali diferite insecte secretă feromoni de marcare a drumului spre sursa de hrană,feromoni de alarmă etc.

Feromonii pot acţiona asupra organismului animalelor receptive.Unii feromoni excită chemoreceptorii specializaţi(olfactivi,gustativi) şi cauzează reacţii reflexe determinate(de orientare,apărare,sexuale etc.).Alţi feromoni pătrund în organism prin tegument,organele respiratorii sau pereţii canalului digestiv, sînt transportaţi în corp de sînge sau hemolimfă şi influenţează organele şi ţesuturile sensibile faţă de ei.Probabil,această acţiune se realizează prin activarea sau blocarea anumitor sisteme enzimatice.Insă unii feromoni acţionează în primul rînd asupra centrilor nervoşi,chemoreceptorilor sistemului vascular şi organelor interne sau glandelor endocrine.

Eliberarea feromonilor la insecte depinde de conţinutul hormonilor specifici în sînge.

14.3.HORMONII PLANTELOR

Hormonii plantelor sau fitohormonii controlează diferite etape ale morfogenezei şi activitatea funcţională a organismului vegetal.In prezent se cunosc cinci grupe de fitohormoni: auxinele, giberelinele,citokininele,acidul abscisic şi etilena.

Grupa auxinelor are ca reprezentant principal acidul indolil-3-acetic(AIAc) care se descoperă în bacterii,ciuperci,plante inferioare şi superioare.In plante acidul indolil-3-acetic se sintetizează din triptofan(fig.14.21),preponderent în punctele terminale de creştere,de unde difuzează în jos prin tulpină şi inhibă dezvoltarea mugurilor laterali.Totodată,acest hormon sti-

mulează creşterea tulpinii,favorizînd dezvoltarea predominantă a vîrfului plantei.AIAc influenţează multe procese în plante.El reglează atît diviziunea cît şi creşterea şi diferenţierea celulelor vegetale.S-a constatat că AIAc participă în reglarea fototropismului,deci a tendinţei plantelor de a se orienta spre lumină.

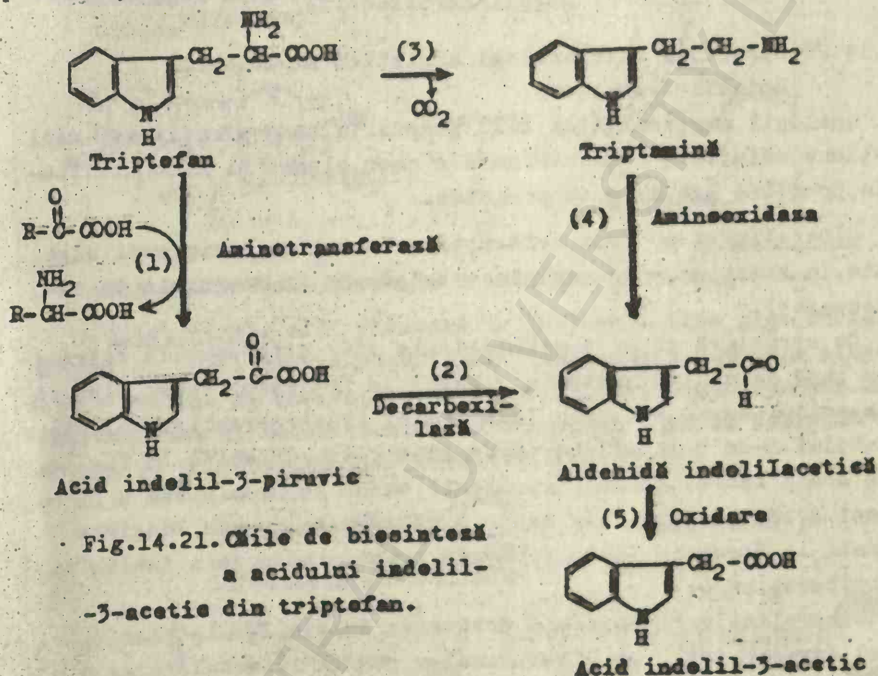


Fig.14.21.Căile de biosinteză a acidului indolil-3-acetic din triptofan.

Deşi mecanismul molecular de acţiune al AIAc nu este elucidat,s-a stabilit că această substanţă activează sinteza ARNm. AIAc determină eliberarea receptorului său proteinic din plasmalemă,cu care formează un complex capabil să stimuleze ARN-polimeraza din nucleol.AIAc de asemenea influenţează translaţia.Ionii H^+ şi Ca^{2+} ar juca rolul de mediatori ai acţiunii AIAc asupra creşterii şi nutriţiei celulei vegetale.

Unele combinaţii chimice sintetizate în laborator exercită asupra plantelor o acţiune fiziologică analoagă cu cea a AIAc. Asemenea substanţe sînt unii derivaţi cloruraţi ai acidului fenoxiacetic,ca de exemplu,acidul 2,4-diclorfenoxiacetic(2,4-D) şi

derivaţii acizilor naftilalkilcarboxilici,cum ar fi acidul 1-naftilacetic şi acidul β-naftoxiacetic(fig.14.22).

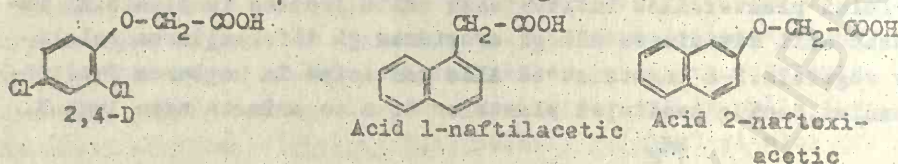


Fig.14.22.Structura unor analogi sintetici ai acidului indolil-3-acetic.

Analogii menţionaţi ai AIAc posedă în concentraţii mai mari o acţiune selectivă de distrugere a unor plante şi sînt utilizaţi în practica agricolă ca erbicide.

Giberelinele au fost evidenţiate la bacterii,ciuperci,alge, plante.In cantitatea cea mai mare se găsesc în seminţele imature(necoapte).

Ca structură chimică giberelinele sînt diterpenoide tetraciclice care se sintetizează în plastidele frunzelor verzi,plecînd de la acidul mevalonic,prin intermediul trans-geranilgeranildifosfatului.S-au identificat 60 de gibereline diferite.In fig.14.23 se arată într-o formă prescurtată calea de biosinteză a giberelinei A_1.Retardanţii,substanţe sintetice ce opresc lungirea tulpinii la plantele intacte,posedă proprietatea de a inhiba sinteza giberelinelor.

Giberelinele favorizează creşterea tulpinilor la plante.Efectul caracteristic al giberelinelor constă în accelerarea diviziunii celulelor meristemului terminal al lăstarului.Spre deosebire de auxine,giberelinele nu stimulează creşterea rădăcinilor. La unele specii de plante giberelinele intervin în diferenţierea sexului.Giberelinele activează de asemenea germinarea seminţelor la multe plante.

In ce priveşte mecanismul de acţiune al giberelinelor,s-a constatat că ele servesc ca activatori ai genelor şi prin aceasta înlesnesc sinteza ARNm şi proteinelor specifice(α-amilază, protează,ribonuclează şi alte hidrolaze).Alături cu acest efect, giberelinele induc şi activarea enzimelor preexistente,de exemplu,a β-amilazei.Există date care dovedesc că giberelinele influenţează proprietăţile şi biogeneza membranelor celulare.

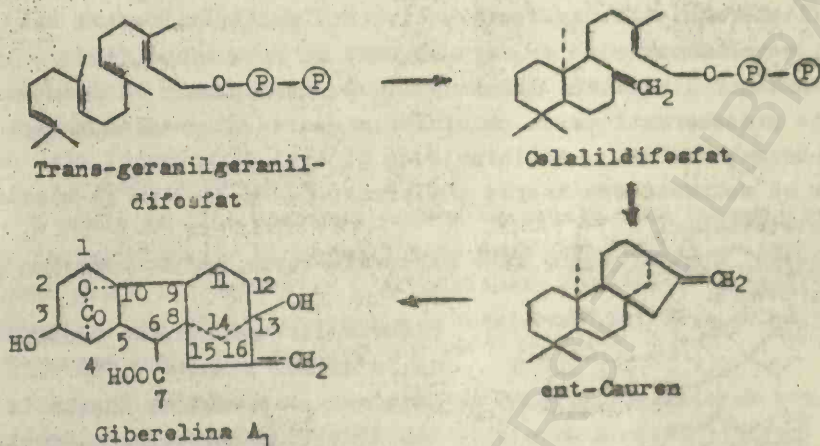


Fig.14.23.Unele etape în biosinteza giberelinei A_1 .

Citokininele sînt prezente în microorganisme,alge,ferigi, mușchi și multe plante superioare.Citokininele naturale alcătuiesc o familie de derivați ai N-6-(Δ^2-izopentenil)-adeninei.Un reprezentant al citokininelor este zeatina care se formează din 5'-AMP și Δ^2-izopentenildifosfat(fig.14.24).

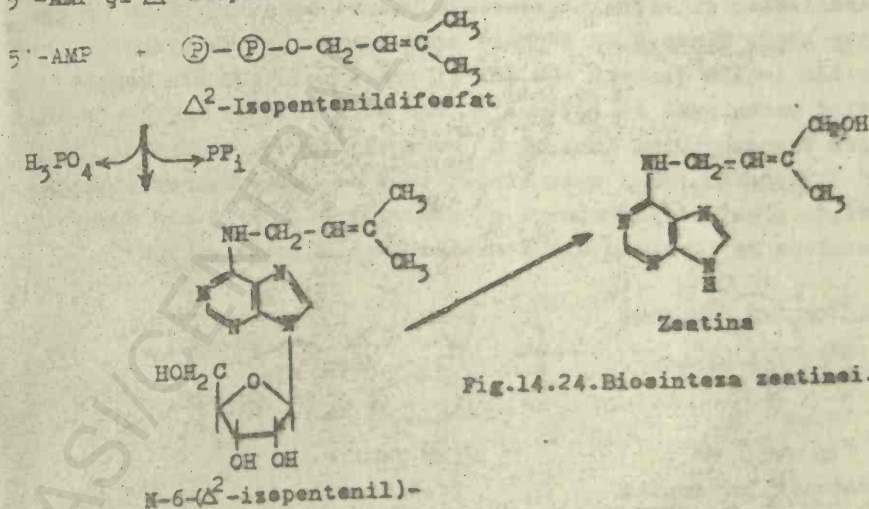
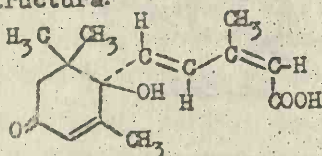


Fig.14.24.Biosinteza zeatinei.

Citokininele participă în reglarea proceselor fiziologice pe parcursul întregii ontogeneze a plantelor superioare.Ca și

alţi fitohormoni,ele manifestă activităţi multiple.Efectul cel mai tipic al citokininelor,care se află la baza identificării lor, este inducţia diviziunii celulelor.Insă citokininele influenţează şi alte procese: extinderea celulelor,mişcarea stomatelor,absorbţia substanţelor et   tokininele,ca şi alţi fitohormoni,sînt capabile să activeze replicarea ADN,transcrierea genelor şi biosinteza proteinelor.

Acidul abscisic(AAb) face parte din seria sesqiterpenelor şi are structura:



Sinteza AAb are loc fie plecînd de la acidul mevalonic,fie prin scindarea carotenilor.Bogate în AAb sînt frunzele bătrîne,fructele coapte,mugurii şi seminţele în repaus.

Ca şi alţi fitohormoni,AAb exercită o acţiune fiziologică diversă.O acţiune bine studiată a AAb este inhibarea creşterii plantelor.Datorită acestei capacităţi el aparţine inhibitorilor creşterii.In multe cazuri AAb se comportă ca antagonist al AIAc, giberelinelor şi citokininelor.AAb uneori este privit ca un represor genic general,care pregăteşte planta pentru starea de repaus.AAb inhibă sinteza ADN,ARN şi proteinelor.Un alt aspect privind mecanismul de acţiune al AAb se referă la influenţa lui asupra transportului ionilor H^+ prin membranele celulare.

Etilena($CH_2=CH_2$) este sintetizată de unele bacterii şi ciuperci,de plantele inferioare şi superioare.In plantele superioare,etilena se formează din S-adenozilmetionină(fig.14.25).

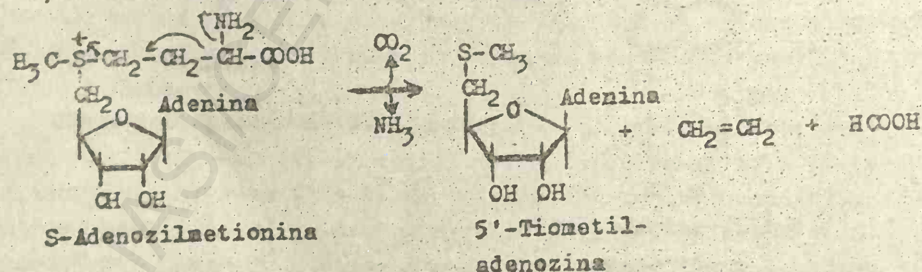


Fig.14.25.Calea de formare a etilenei în plante.

Ca fitohormon,etilena produce multe efecte,incluzînd accele-

rarea coacerii fructelor şi îmbătrînirea tuturor organelor plantei.Etilena frînează mitoza în meristemele rădăcinii,lăstarilor şi mugurilor în teacă.

Alţi fitohormoni

O serie de date pledează pentru existenţa unui hormon special al înfloririi - florigenul,care după M.H.Ciailahian cuprinde două grupe de combinaţii : giberelinele implicate în controlul creşterii tulpinii şi antezinele - substanţe ipotetice,avînd rol în formarea mugurilor florali.

Trebuie menţionat că în reglarea creşterii plantelor are o importanţă deosebită lumina şi cromoproteina numită fitocrom.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVA

1.Anisimov A.A. i dr.,Osnovi biohimii,„Vîsgaja gkola",Moskva,1986
2.Artenie Vl.,Vîdelenie,ocistka i svoistva holinaţetilazî,Teză de doctorat.Universitatea de Stat „M.V.Lomonosov",Moscova,1966
3.Artenie Vl.,Curs de chimie biologică.Vol.1,Universitatea „Al.I.Cuza",Iaşi,1971
4.Artenie Vl.,Curs de chimie biologică.Vol.II,Universitatea „Al.I.Cuza",Iaşi,1976
5.Artenie Vl.,Acizii nucleici şi rolul lor genetic.Universitatea „Al.I.Cuza",Iaşi,1984
6.Artenie Vl.,Biochimia şi organizarea moleculară a cromozomului eucariot,Universitatea „Al.I.Cuza",Iaşi,1987
7.Bedeleanu D.,Manta I.,Biochimie medicală şi farmaceutică.Vol.I. Biochimie structurală.Editura „Dacia",Cluj-Napoca,1985
8.Bernfeld P.,Biogenesis of Natural Compounds.Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris,1963
9.Busch H.,Histones and Other Nuclear Proteins.Acad.Press,New York-London,1965
10.Cecetkin A.V. i dr.,Biohimija jivotnîh.„Vîsgaja gkola",Moskva, 1982
11.Chiesa L.,Neuman M.,Vitamine şi antivitamine.Editura Medicală, Bucureşti,1956
12.Dixon M. and Webb E.C.,Enzymes,Second Edition.Longmans,1964
13.Dumitru I.F.,Biochimie.Editura didactică şi pedagogică, Bucureşti,1980
14.Dumitru I.F.,Iordăchescu Dana,Introducere în enzimologie.Editura Medicală,Bucureşti,1981
15.Goodwin T.W. and Mercer E.I.,Introduction to Plant Biochemistry, Second Edition,Pergamon Press,Oxford-New York-Toronto-Sydney-Paris-Frankfurt,1983
16.Gulfî M.F.,Biohimija jirovogo obmena.Izd-vo AN USSR,Kiev,1961
17.Gulfî M.F.,Osnovnîe metaboliceskie ţiklî.„Naukova dumka",Kiev, 1968
18.Heftmann E.,Steroid Biochemistry.Academic Press,New York-London,1970
19.Ivanenko E.F.,Bichimija vitaminov.„Vigcia gkola",Kiev,1970

20.Iordăchescu Dana,Biochimie.Partea II-a.Metabolism intermediar. Universitatea din Bucureşti,1986
21.Jirgensons B.,Natural organic macromolecules.Pergamen Press, Oxford-London-New York-Paris,1962
22.Konenskii A.I.,Biohimija jivotnîh.„Vişa şkola",Kiev,1980
23.Kosower E.M.,Molecular Biochemistry.McGraw-Hill Book Company, Inc.,1962
24.Kucerenko N.E.,Biohimija.„Vîşcia şkola",Kiev,1988
25.Lederer E., Cours de Biochimie: Lipides.Ediscience,Paris,1970
26.Lehninger A.L.,Biochemistry,Second Edition.Worth Publishers, Inc.,New York,1975
27.Metzler D.E.,Biochemistry.The Chemical Reactions of Living Cells.Academic Press,New York-San Francisco-London,1977
28.Mogoş Gh.,Proteinele.Editura Medicală,Bucureşti,1964
29.Neamţu G.,Biochimie vegetală.Editura „Ceres",Bucureşti,1981
30.Neifah S.A. i dr.,Mehanizmî integraţii kletocinogo obmena, „Nauka",Leningrad,1967
31.Newsholme E.A.,Start C.,Regulation in Metabolism,John Wiley & Sons,London-New York-Sydney-Toronto,1973
32. -*- Nomenclatura biochimiei.Sub îngrijirea şi adaptarea prof.dr.doc.I.F.Dumitru.Editura Academiei R.S.România, Bucureşti,1984
33.Petrescu I.,Biochimie.Universitatea din Cluj-Napoca,1986
34.Rawn J.D.,Biochemistry.Harper & Row Publishers,New York,1983
35.Saenger W.,Principles of Nucleic Acid Strcture.Springer-Verlag,New York-Berlin-Heidelberg-Tokyo,1984
36.Spirin A.S.,Molekuliarnaja biologhia: Structura ribosomî i biosintez belka.Moskva,„Vîşşaja şkola",1986
37.Stacey M.,Barker S.A.,Carbohydrates of Living Tissues.D.Van Nostrand Company Ltd.,London-Toronto-New York-Princeton--New Jersey,1962
38.Stepanenko B.N.,Himija i biohimija uglevodov(Monosaharidî). „Vîsşaja şkola",Moskva,1977
39.Stepanenko B.N.,Himija i biohimija uglevodov(polisaharidî). „Vîsşaia şkola",Moskva,1978
40.Stroev E.A.,Biologhiceskaja himija.„Vîsşaia şkola",Moskva, 1986

41.Stryer L.,Biochemistry,Second Edition.W.H.Freeman and Company, San Francisce 1981
42.Tămaş V.,Şerban M.,Cotruţ Maria,Biochimie medicală veterinară.Editura didactică şi pedagogică,Bucureşti,1981
43.Vasilenko IU.K.,Biologhiceskaja himija.„Vîşşaja şkola",Moskva, 1978
44.Vereşciaghin A.G.,Biohimija trigliţeridov.„Nauka",Moskva,1972
45.Watson J.D.,Molecular Biology of The Gene.3rd Edition.W.A. Benjamin,Inc.,1976
46.White A.,Handler P,,Smith E.L.,Hill R.L.,Lehman I.R.,Principles of Biochemistry.McGraw-Hill,Inc.,New York,1978
47.Ycas M.,The Biological Code.North-Holland Publishing Company, Amsterdam-London,1969

EDITURA UNIVERSITĂȚII
„Al. I. Cuza"
CENTRUL DE MULTIPLICARE

LEI 124